

JP 2003-532790 Abstract

## Dyes and methods of reticulocyte enumeration

Patent number: JP2003532790T  
 Publication date: 2003-11-05  
 Inventor: DEKA CHIRANJIT (US); LEE SONG Y (US); SHEN GENE G-Y (US);  
 Applicant: SZYDLO STEPHEN (US); TSAY TSONG-TSEH (US); GUPTA RAVINDER  
 Classification: COULTER INT CORP (US)  
 - international: C09B23/00; C12Q1/02; C12Q1/68; G01N33/48; G01N33/483; G01N33/58  
 - european: C09B23/02; G01N1/30; G01N21/47; G01N21/64H  
 Application number: JP20010583158T 20010504  
 Priority number(s): US20000566298 20000505; WO2001US14522 20010504

Also published as:

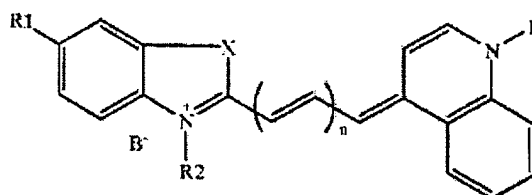
WO0186264 (A1)  
 US6368864 (B1)

Report a data error here

Abstract not available for JP2003532790T

Abstract of corresponding document: US6368864

A dye compound having the formula I: wherein, n is 0, 1, 2, or 3; R<sub>1</sub> is H, alkyl, or an alkoxy group; R<sub>2</sub> is CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>OH, wherein m is 0, 1, 2, or 3; X is O, S, or C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; R is CH<sub>3</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, alkyl, alkylsulfonate, or hydroxyalkyl and B<sup>-</sup> is a counteranion. Red- and blue-excitable dyes based on the above chemical structure are described, and reagents containing them are described for use in staining nucleic acid, more particularly for staining reticulocytes. Also described are methods for detecting reticulocytes using such compositions.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Best Available Copy

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-532790

(P2003-532790A)

(43) 公表日 平成15年11月5日 (2003.11.5)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマート* (参考)
C 0 9 B 23/00		C 0 9 B 23/00	M 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
1/68		1/68	A 4 H 0 5 6
G 0 1 N 33/48		G 0 1 N 33/48	P
33/483		33/483	C
		審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 100 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-583158(P2001-583158)  
 (86) (22) 出願日 平成13年5月4日 (2001.5.4)  
 (85) 翻訳文提出日 平成14年11月1日 (2002.11.1)  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 0 1 / 1 4 5 2 2  
 (87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 8 6 2 6 4  
 (87) 国際公開日 平成13年11月15日 (2001.11.15)  
 (31) 優先権主張番号 0 9 / 5 6 6 , 2 9 8  
 (32) 優先日 平成12年5月5日 (2000.5.5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (81) 指定国 E P (A T, B E, C H, C Y, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E, T R), J P

(71) 出願人 コールター インターナショナル コーポ  
 レーション  
 アメリカ合衆国, フロリダ 33196, マイ  
 アミ, 32-エー02, サウスウエスト 147  
 アベニュー 11800  
 (72) 発明者 デカ, チランジト  
 アメリカ合衆国, フロリダ 33196, マイ  
 アミ, サウスウエスト 164 プレース  
 10063  
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 未成熟赤血球細胞における核酸の検出用色素及び方法

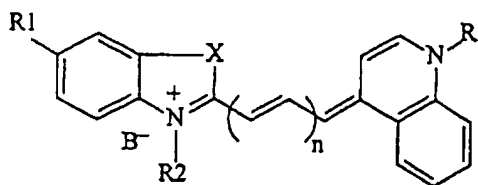
## (57) 【要約】

本発明に係る色素は、それらが結合される分子又は化合物の存在を検出するためのマーカー又はタグを含む多くの目的に有用である。上記色素は赤色-励起可能又は青色-励起可能でありうる。本発明に係る色素は核酸の染色に特に好都合である。例えば、これらの色素は網状赤血球内のRNAの染色に特に好適である。他の例示的な使用においては、これらの色素は有核の赤血球内のDNAの染色に好適である。典型的に、核酸の染色において使用されるとき、上記色素は試薬溶液中に調合される。さらに、本発明は色素分子の細胞膜の通過を促進するための組成物及び方法を提供する。上記速い染色はサンプルが少なくとも1の界面活性剤、そして場合によりスルホン酸又はその塩の存在下で、本発明に係る色素組成物で接触されることを必要とする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の式：

【化1】



を有する色素であって、 $n$ は0、1、2又は3である； $R_1$ はH、アルキル又はアルコキシ基である； $R_2$ は $CH_2$ 、 $(CH_2)_m OH$ であり、ここで、 $m$ は0、1、2又は3である； $X$ はO、S又は $C(CH_3)_2$ である； $R$ は $CH_3$ 、 $CH(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH_2OH$ 、アルキル、アルキルスルフォネート又はヒドロキシアルキルである及び $B^-$ は対陰イオンである色素。

【請求項2】  $n$ は1であり、 $R_1$ はHであり、 $R$ は $CH_2CH_2OH$ であり、 $R_2$ は $CH_2CH_2OH$ であり、そして $X$ はSである、請求項1に記載の色素。

【請求項3】  $n$ は1であり、 $R_1$ はHであり、 $R$ は $CH(CH_3)_2$ であり、 $R_2$ は $CH_2CH_2OH$ であり、そして $X$ はSである、請求項1に記載の色素。

【請求項4】  $n$ は1であり、 $R_1$ はHであり、 $R$ は $CH_3$ であり、 $R_2$ は $CH_2CH_2OH$ であり、そして $X$ はSである、請求項1に記載の色素。

【請求項5】  $n$ は1であり、 $R_1$ は $CH_3$ であり、 $R$ は $CH_3$ であり、 $R_2$ は $CH_2CH_2OH$ であり、そして $X$ はSである、請求項1に記載の色素。

【請求項6】  $n$ は1であり、 $R_1$ は $CH_3$ であり、 $R$ は $CH(CH_3)_2$ であり、 $R_2$ は $CH_2CH_2OH$ であり、そして $X$ はSである、請求項1に記載の色素。

【請求項7】  $n$  は1であり、 $R_1$  は $CH_3$ であり、 $R$ は $CH_2CH_2OH$ であり、 $R_2$  は $CH_2CH_2OH$ であり、そして $X$ は $S$ である、請求項1に記載の色素。

【請求項8】 請求項1に記載の色素を含む、核酸染色用色素組成物。

【請求項9】 請求項1に記載の色素を含む、網状赤血球染色用色素組成物。

【請求項10】 さらに界面活性剤を含む、請求項9に記載の網状赤血球染色用色素組成物。

【請求項11】 さらに約0から約1%までの量で洗剤を含む、請求項9に記載の色素組成物。

【請求項12】 前記洗剤はオクチルフェノキシポリ(エチレンオキシ)エタノール、エトキシ化オクチルフェノール、直鎖アルコールアルコキシレートから成る群から選ばれる、請求項11に記載の色素組成物。

【請求項13】 さらにスルホン酸又はその塩を含む、請求項9に記載の色素組成物。

【請求項14】 前記界面活性剤は非イオン性界面活性剤を含む、請求項10に記載の色素組成物。

【請求項15】 前記非イオン性界面活性剤はドデシル- $\beta$ -D-マルトシド、N,N-ビス[3-D-グルコン-アミドプロピル]コールアミド、ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロック共重合体、N-テトラデシル- $\beta$ -D-マルトシド、ダコニル-N-メチル-グルカミド、n-ドデシル- $\beta$ -D-グルコピラノシド、n-デシル- $\beta$ -D-グルコピラノシド、ステアリン酸のポリエチレングリコールエステル、エトキシ化ココモノグリセリド、オクチフェノキシポリ(エチレンオキシ)エタノール、エトキシ化オクチルフェノール、及び直鎖アルコールから成る群から選ばれる、請求項14に記載の色素組成物。

【請求項16】 前記界面活性剤は陽イオン性界面活性剤を含む、請求項10に記載の色素組成物。

【請求項17】 前記陽イオン性界面活性剤はココヒドロキシエチルイミダ

ジリン、塩化ラウリルトリメチルアンモニウム、臭化デシルトリメチルアンモニウム、及び臭化オクチルトリメチルアンモニウムから成る群から選ばれる、請求項16に記載の色素組成物。

【請求項18】 前記界面活性剤は陰イオン性界面活性剤を含む、請求項10に記載の色素組成物。

【請求項19】 前記陰イオン性界面活性剤はアンモニウムペルフルオアルキルカルボキシレート、ナトリウムラウロイルミリストイルラクチレートから成る群から選ばれる、請求項18に記載の色素組成物。

【請求項20】 前記界面活性剤は双極性イオン性界面活性剤を含む、請求項10に記載の色素組成物。

【請求項21】 前記双極性界面活性剤はラウルアミドプロピルベタイン、N-テトラデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネート、N-ドデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネート、ココアミドプロピルベタイン、ココアミドスルフォベタイン、N-ドデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネート、及びN-テトラデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネートから成る群から選ばれる、請求項20に記載の色素組成物。

【請求項22】 さらに保存料を含む、請求項9に記載の色素組成物。

【請求項23】 前記保存料は5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン及び2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを含む、請求項22に記載の色素組成物。

【請求項24】 前記スルホン酸はp-トルエンスルホン酸である、請求項13に記載の色素組成物。

【請求項25】 前記p-トルエンスルホン酸の濃度は約0.01~約250  $\mu$ Mである、請求項24に記載の色素組成物。

【請求項26】 前記スルホン酸塩はp-トルエンスルホン酸ナトリウム、p-トルエンスルホン酸銀、p-トルエンスルホン酸亜鉛から成る群から選ばれる、請求項13に記載の色素組成物。

【請求項27】 前記p-トルエンスルホン酸ナトリウムの濃度は約0.

0.1～約250  $\mu$ Mである、請求項26に記載の色素組成物。

【請求項28】 核酸を含むサンプルを請求項1に記載の色素と接触させる段階を含む、核酸染色法。

【請求項29】 前記サンプルは細胞を含み、そして前記サンプルは界面活性剤の存在下で上記色素により接触される、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 前記サンプルは全血を含む、請求項28に記載の方法。

【請求項31】 (a) 網状赤血球を含むサンプルを請求項1に記載の化合物と接触させ、それにより上記網状赤血球が前記化合物により染色される；及び  
(b) 網状赤血球の存在を検出するために、染色された網状赤血球を流動細胞光度測定法により分析する：の段階を含む、網状赤血球分析法。

【請求項32】 流動細胞光度測定法による前記分析は1の蛍光パラメーター及び光分散、光学吸収、軸光損失、DC電気インピーダンス、及び無線周波数(RF)伝導性及びそれらの組み合わせから成る群から選ばれる少なくとも1のパラメーターの計測を含む、請求項31に記載の方法。

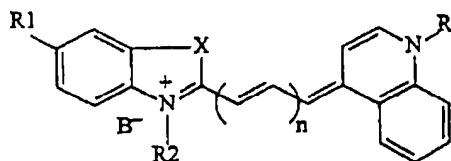
【請求項33】 (a) 細胞を含むサンプルを請求項1に記載の色素、界面活性剤、及びスルホン酸又はその塩と接触させる、及び

(b) 前記混合物を約1分間までインキュベートする  
の段階を含む、色素組成物の細胞膜の通過を促進する方法。

【請求項34】 前記インキュベーションは約20℃～約40℃の温度範囲で行われる、請求項33に記載の方法。

【請求項35】 以下の式：

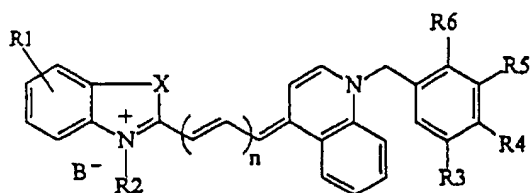
【化2】



を有する色素であって、 $n$ は0、1、2又は3である； $R_1$ はH、アルキル又はアルコキシ基である； $R_2$ は $CH_2$ 、 $(CH_2)_m OAc$ であり、ここで、 $m$ は0、1、2又は3である； $X$ はO、S又は $C(CH_3)_2$ である； $R$ は $CH_3$ 、 $CH(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH_2OAc$ 、アルキル、アルキルスルフォネート又はヒドロキシアルキル及び $B^-$ は対陰イオンである、色素。

【請求項36】 以下の式：

【化3】



に記載の色素であって、 $n$ は0、1又は2である； $R_1$ はH、アルキル又はアルコキシ基である； $R_2$ は $CH_2$ 、 $(CH_2)_m OH$ 又は $CH_3$ である； $X$ はO、S又は $C(CH_3)_2$ である； $B^-$ は対陰イオンである、そして $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ は特定化合物色素-3～色素-6についての式により示されるさまざまな置換基である、色素。

【請求項37】  $n=1$ ； $R_1=H$ ； $R=CH_3$ 、 $R_2=CH_2CH_2OAc$ ； $X=S$ 、及び $B^-$ は $Br^-$ である、請求項35に記載の色素。

【請求項38】  $n=1$ 、 $R_1=H$ 、 $R_2=R=CH_2CH_2OAc$ 、 $X=S$ 、及び $B^-$ は $Br^-$ である、請求項35に記載の色素。

【請求項39】  $n=1$ ； $X=S$ ； $R_1=CH_2CH_2OH$ ； $R_2=R_4=R_5=H$ ； $R_3=COCH_3$ ；及び $B^-$ は $Br^-$ である、請求項36に記載の色素。

【請求項40】  $n=1$ ； $X=S$ ； $R_1=CH_2CH_2OH$ ； $R_2=R_4=R_5=H$ ； $R_3=COCH_3$ ；及び $B^-$ は $Br^-$ である、請求項36に記載の色

素。

【請求項41】  $n=1$  ;  $X=S$  ;  $R_1=CH_2CH_2OH$  ;  $R_2=R_3=R_4=R_5=H$  ; 及び  $B^-$  は  $Br^-$  である、請求項36に記載の色素。

【請求項42】  $n=1$  ;  $X=S$  ;  $R_1=CH_2CH_2OH$  ;  $R_2=R_3=R_4=H$  ;  $R_5=B(OH)_2$  ; 及び  $B^-$  は  $I^-$  である、請求項36に記載の色素。

【請求項43】 溶媒中に溶解された請求項35又は請求項36に記載の化合物を含む、核酸染色用色素組成物。

【請求項44】 請求項35又は請求項36に記載の化合物を含む、血液細胞染色用色素組成物。

【請求項45】 上記血液細胞は有核の赤血球である、請求項35又は請求項36に記載の化合物を含む、血液細胞染色用色素組成物。

【請求項46】 上記血液細胞は網状赤血球である、請求項35又は請求項36に記載の化合物を含む、血液細胞染色用色素組成物。

【請求項47】 さらに界面活性剤を含む、請求項44に記載の網状赤血球染色用色素組成物。

【請求項48】 さらに約0%～約1%までの量で洗剤を含む、請求項44に記載の色素組成物。

【請求項49】 前記洗剤はオクチルフェノキシポリ(エチレンオキシ)エタノール、エトキシ化オクチルフェノール、及び直鎖アルコールアルコキシレートから成る群から選ばれる、請求項48に記載の色素組成物。

【請求項50】 さらにスルホン酸又はその塩を含む、請求項44に記載の色素組成物。

【請求項51】 前記界面活性剤は非イオン性界面活性剤を含む、請求項47に記載の色素組成物。

【請求項52】 前記非イオン性界面活性剤はドデシル- $\beta$ -D-マルトシド、N,N-ビス[3-D-グルコン-アミドプロピル]コールアミド、ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロック共重合体、N-テトラデシル- $\beta$ -D-マルトシド、ダコニル-N-メチル-グルカミド、n-ドデシル- $\beta$ -D-



ーグルコピラノシド、 $n$ -デシル- $\beta$ -D-グルコピラノシド、ステアリン酸のポリエチレングリコールエステル、エトキシ化ココモノグリセリド、オクチルフェノキシポリ(エチレンオキシ)エタノール、エトキシ化オクチルフェノール、及び直鎖アルコールアルコキシレートから成る群から選ばれる、請求項51に記載の色素組成物。

【請求項53】 前記界面活性剤は陽イオン性界面活性剤を含む、請求項47に記載の色素組成物。

【請求項54】 前記陽イオン性界面活性剤はココヒドロキシエチルイミダゾリン、塩化ラウリルトリメチルアンモニウム、臭化デシルトリメチルアンモニウム、及び臭化オクチルトリメチルアンモニウムからなる群から選ばれる、請求項53に記載の色素組成物。

【請求項55】 前記界面活性剤は陰イオン性界面活性剤を含む、請求項47に記載の色素組成物。

【請求項56】 前記陰イオン性界面活性剤はアンモニウムペルフルオロアルキルカルボキシレート、ナトリウムラウロイルミリストイルラクチレートから成る群から選ばれる、請求項55に記載の色素組成物。

【請求項57】 前記界面活性剤は双極性界面活性剤を含む、請求項47に記載の色素組成物。

【請求項58】 前記双極性界面活性剤はラウルアミドプロピルベタイン、 $N$ -テトラデシル- $N$ ， $N$ -ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネート、 $N$ -ドデシル- $N$ ， $N$ -ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネート、ココアミドプロピルベタイン、ココアミドスルフォベタイン、 $N$ -ドデシル- $N$ ， $N$ -ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネート、及び $N$ -テトラデシル- $N$ ， $N$ -ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネートから成る群から選ばれる、請求項57に記載の色素組成物。

【請求項59】 さらに保存料を含む、請求項44に記載の色素組成物。

【請求項60】 前記保存料は5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン及び2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを含む、請求項59に記載の色素組成物。

【請求項61】 前記スルホン酸は p-トルエンスルホン酸である、請求項50に記載の色素組成物。

【請求項62】 前記 p-トルエンスルホン酸の濃度は約 0.01～約 250  $\mu$ M である、請求項61に記載の色素組成物。

【請求項63】 前記スルホン酸塩は p-トルエンスルホン酸ナトリウム、p-トルエンスルホン酸銀、p-トルエンスルホン酸亜鉛から成る群から選ばれる、請求項50に記載の色素組成物。

【請求項64】 前記 p-トルエンスルホン酸ナトリウムの濃度は約 0.01～約 250  $\mu$ M である、請求項63に記載の色素組成物。

【請求項65】 核酸を含むサンプルを請求項35又は請求項36に記載の色素と接触させる段階を含む、核酸染色方法。

【請求項66】 前記サンプルは血液細胞を含む、請求項65に記載の方法。

【請求項67】 前記サンプルは界面活性剤の存在下で上記色素により接触される、請求項66に記載の方法。

【請求項68】 前記サンプルは成熟赤血球及び網状赤血球は溶解するが、有核の赤血球は保持した後に、上記色素により接触される、請求項66に記載の方法。

【請求項69】 (a) 網状赤血球を含むサンプルを請求項35又は請求項36に記載の化合物で接触させることにより、上記網状赤血球は前記化合物により染色される；及び (b) 網状赤血球の存在を検出するために、流動細胞光度測定法により染色された網状赤血球を分析する：の段階を含む、網状赤血球の分析方法。

【請求項70】 流動光度測定法による前記分析は1の蛍光パラメーター及び光分散、光学吸収、軸光損失、DC電気インピーダンス、及び無線周波数(RF)伝導性及びそれらの組み合わせから成る群から選ばれる少なくとも1のパラメーターの計測を含む、請求項69に記載の方法。

【請求項71】 (a) 細胞を含むサンプルを請求項35又は請求項36に記載の色素、界面活性剤、及びスルホン酸又はその塩と接触させる、及び

(b) 前記混合物を約1分間までインキュベートする  
の段階を含む、色素組成物の細胞膜の通過を促進させる方法。

【請求項72】 前記インキュベーションは約20℃～約40℃の温度範囲  
で行われる、請求項67に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

発明の分野

本発明は一般的に、蛍光核酸結合色素を使用することによる流動細胞光度測定法による、赤血球細胞における核酸の検出用新規色素、色素組成物、及び方法の分野に関する。より詳しくは、本発明は網状赤血球及び有核の赤血球の計測用試薬及び方法を提供する。

## 【0002】

発明の背景

赤血球の分析及びその未成熟の予備集団の計測は診断血液学の価値のある成分である。例えば、ヒト末梢血中の網状赤血球、すなわち、未成熟の赤血球の計測は出血、貧血の診断、骨髄移植のモニターにおいて及び化学療法及び血液細胞産生に関する他の障害を経験する患者のモニターに有用である [米国特許第5, 360, 739; H. Shapiro, *Practical Flow Cytometry*, 3<sup>rd</sup> edit, 1995; Wiley-Liss, New York; Davis et al, (1990) *Pathobiol.*, 58:99-106; Hoy, (1990) *Bailliere's Clin. Haemat.*, 3:977-988; H. J. Tanke, *Reticulocytes and Mature Erythrocytes in Flow Cytometry in Haematology* (1992) Academic Press Ltd., pp. 75-93]。網状赤血球はリボ核酸 (RNA) を含むため、RNAに結合する励起可能な色素で染色されると、これらの細胞は好適な波長の光源により照射されたとき蛍光を発する。RNA結合色素はRNAを欠く成熟赤血球 (RBCs) から網状赤血球を区別するために使用されてきた。

## 【0003】

比較的大きな網状赤血球集団の蛍光強度の分布は速くそして信頼できる様式で流動細胞光度測定法により決定されることができ、そして網状赤血球の異なる成熟段階は、RNAの含有量における相違により反映されるように、区別されうる

。

赤色ー励起可能な色素の使用は、上記色素は比較的費用のかからないダイオード又はHeNeレーザーで励起することにより検出されるので、所望される。しかしながら、ダイオードレーザー及び赤色ー励起可能な色素を網状赤血球の高速流動細胞光度測定分析に使用するための、初期の分野におけるはじめの努力は成功ではなかった。Yamamoto, 米国特許第5, 563, 070号は、大量のTO-PRO-3、赤色ー励起可能な色素の添加、それに続く30分間のインキュベーションは生きた網状赤血球内のRNAを染色することを示した。しかしながら、上記方法は、サンプル調製時間が長く、そしてそれぞれのサンプルを染色するのに必要とされる大量の色素のために試験当たりの費用が高いため、高いサンプル処理量を必要とする臨床研究室における網状赤血球の日常の分析には実用的でない。

## 【0004】

チアゾールブルー（TB）と呼ばれる赤色ー励起可能な色素は米国特許第4, 957, 870号において示された。しかしながら、この特許（米国特許第4, 957, 870号）において示されるように、この色素も約30分間の、長いインキュベーション時間を必要とする。

Akai et al., 米国特許第5, 821, 127号も、赤色領域における蛍光を介して費用のかからない検出器を用いて網状赤血球を検出することができる蛍光色素の調製を示した。しかしながら、上記サンプルは約40℃の高温でのインキュベーションを必要とする。

## 【0005】

より最近では、米国特許第5, 994, 138号は、約35℃の高温での洗剤及びイオノフォアと共の赤色ー励起可能な色素の使用を介して網状赤血球を染色することを示した。しかしながら、網状赤血球の染色は環境温度が使用されたとき成功ではなかった。

Fan et al. (米国第5, 411, 891号、米国第5, 360, 739号) は色素及び網状赤血球RNAの間の特異的結合定数及び上記色素の透過率はそれぞれの色素で異なり、そしてどんな状況下で特定の色素が赤血球膜を速

く通過し、網状赤血球を染色するのか予測することは不可能であることをはっきりと示す。このことはAkai et. al (米国第5, 821, 127号)によりさらに支持された。

したがって、本分野において、赤色領域で励起可能であり、そして費用のかからない容易に入手可能な赤色－照明装置を使用しうる、色素の使用を介した、室温での細胞内RNAの速い染色を可能にする色素、組成物及び方法の必要性が存在する。さらに、本分野において、赤色－励起可能な色素にのみでなく、青色波長におけるように他の波長で励起可能な色素にも使用できる、色素組成物及び方法の必要性が存在する。そうすることにより、網状赤血球の容易で正確な検出が励起波長の特定の制限なしに達成されうる。

#### 【0006】

網状赤血球に加えて、臨床診断において重要な未成熟の赤血球の他の型は有核の赤血球(NRBCs)である。網状赤血球とは対照的に、NRBCsはDNAを含む。NRBCsは通常脊髄内に起こるが、末梢血中にはない。しかしながら、貧血及び白血病の如きある疾患においては、NRBCsは末梢血にも起こる。したがって、NRBCsを計測することは臨床的に重要である。NRBCsはDNAを含むので、蛍光検出及びNRBCsの計測はこれらの細胞をDNAを認識する色素で染色することにより可能でありうる。したがって、本分野において、NRBCs及び網状赤血球の両方が異なる方法を使用する同じ色素の使用を介して計測されうるように、細胞内DNA及びRNAの両方を染色することができる、色素及び組成物の必要性が存在する。

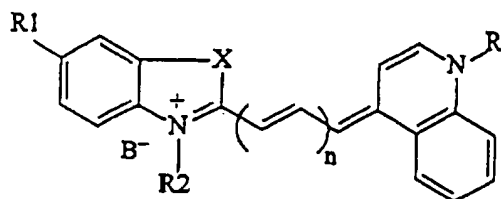
#### 【0007】

##### 発明の要約

1の局面においては、本発明は群I、群II、及び群IIIとして示される3群の新規色素を提供し：

群Iは以下の一般式：

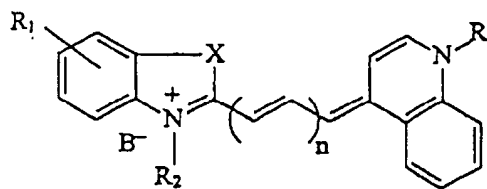
#### 【化4】



を有し、式中、 $n$ は0、1、2又は3であり； $R_1$ はH、アルキル又はアルコキシ基であり； $R^2$ は $\text{CH}_2$ 、 $(\text{CH}_2)_m \text{OH}$ であり、ここで、 $m$ は0、1、2又は3であり； $X$ はO、S又は $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ であり； $R$ は $\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、アルキル、アルキルスルフォネート又はヒドロキシアルキルであり；そして $\text{B}^-$ は対陰イオンである；

群I Iは以下の一般式：

【化5】



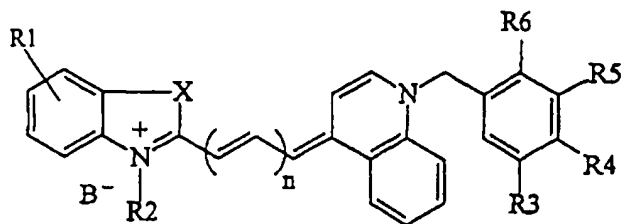
を有し、式中、 $n$ は0、1、2又は3であり； $R_1$ はH、アルキル又はアルコキシ基であり； $R_2$ は $\text{CH}_2$ 、 $(\text{CH}_2)_m \text{OAc}$ であり、ここで、 $m$ は0、1、2又は3であり； $X$ はO、S又は $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ であり； $R$ は $\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OAc}$ 、アルキル、アルキルスルフォネート又はヒドロキシアルキルであり；そして $\text{B}^-$ は対陰イオンである；

【0008】

そして、

群-I I Iは以下の一般式：

【化6】



を有し、式中、 $n$ は0、1又は2であり； $R_1$ はH、アルキル又はアルコキシ基であり； $R_2$ は $CH_2$ 、 $(CH_2)_m OH$ 又は $CH_3$ であり； $X$ はO、S又は $C(CH_3)_2$ であり； $B^-$ は対陰イオンであり、そして $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ は特定化合物色素-3～色素-6についての式により示されるさまざまな置換基である。

#### 【0009】

他の局面においては、本発明は本発明に係る色素を含む試薬及び溶媒を提供する。

さらに他の局面においては、本発明は細胞膜を通る色素分子の速い通過を促進させる組成物及び方法を提供する。上記速い染色はサンプルが少なくとも1の界面活性剤及び場合によりスルホン酸又はその塩の存在下で本発明に係る色素組成物と接触されることを必要とする。

#### 【0010】

本発明の他の局面及び利点は本発明の詳細な説明から容易に明らかになるであろう。

#### 【0011】

#### 発明の詳細な説明

本発明は、網状赤血球を染色するために細胞膜を通る色素の速い移動を促進するための組成物及び方法に加えて、核酸を染色する色素を提供する。都合の良いことに、本発明に係る色素は核酸に結合しているとき、結合していないときよりも、顕著に強い蛍光を示すことにより特徴付けられる。



好ましい態様においては、本発明に係る色素、組成物及び方法を使用する分析に好適な網状赤血球細胞集団を含むサンプルは全血又は染色前のある追加のプロセスにより強化された又は減少された血液サンプルから好ましく選ばれる。上記強化又は減少のプロセスは、他のものの中では、遠心分離、フィコールで補助された重力分離又は磁気分離を含みうる。

都合の良いことに、本発明に係る色素、方法及び組成物は細胞の固定を必要とせず、そしてそれゆえ代謝的に活性な細胞の分析における使用に特によく合う。しかしながら、上記細胞集団の選択は本発明上の制限ではない。

#### 【0012】

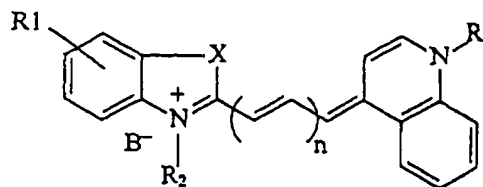
上記に議論されるように、赤色又は青色領域において蛍光を発する能力を有する、いくつかの色素のみが網状赤血球の計測に好適である。これらの色素は、しかしながら、高温の使用を必要とし、長いインキュベーション時間を要し、大量の非特異的なバックグラウンド蛍光を作出し、及び／又はRNAの存在下で蛍光の高まりをほとんど示さない。本発明は、核酸に結合し、そして環境温度で蛍光を介して網状赤血球の検出を可能にさせる、赤色及び青色一励起可能な新規色素を提供する。好適には、本発明に係る色素は実質的なバックグラウンド蛍光の非存在下で網状赤血球の速い検出を優先的に可能にさせる方法に適合される。本発明に係る方法の利点は上記染色が達成される速さ及び室温で全血を用いて達成されうるといふ事実である。

#### 【0013】

本発明は以下に示される3群の新規色素を提供する：

群1は以下の一般式：

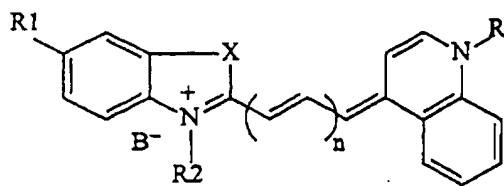
#### 【化7】



を有し、式中、 $n$ は0、1、2又は3であり； $R_1$ はH、アルキル又はアルコキシ基であり； $R_2$ は $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_m\text{OH}$ 、であり、ここで、 $m$ は0、1、2又は3であり； $X$ はO、S又は $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ であり； $R$ は $\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、アルキル、アルキルスルフォネート又はヒドロキシアルキルであり；そして $\text{B}^-$ は対陰イオンである。

群 I I は以下の一般式：

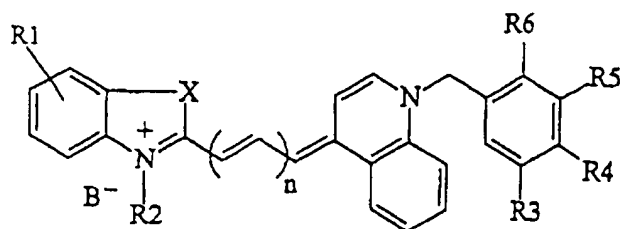
【化8】



を有し、式中、 $n$ は0、1、2又は3であり； $R_1$ はH、アルキル又はアルコキシ基であり； $R_2$ は $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_m\text{OAc}$ であり、ここで、 $m$ は0、1、2又は3であり； $X$ はO、S又は $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ であり； $R$ は $\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OAc}$ 、アルキル、アルキルスルフォネート又はヒドロキシアルキルであり；そして $\text{B}^-$ は対陰イオンである。

群 I I I は以下の一般式：

【化9】



を有し、式中、 $n$ は0、1又は2であり； $R1$ はH、アルキル又はアルコキシ基であり； $R2$ は $CH_2$ 、 $(CH_2)_m$ 、 $OH$ 又は $CH_3$ であり； $X$ はO、S又は $C(CH_3)_2$ であり； $B^-$ は対陰イオンであり、そして $R3$ 、 $R4$ 、 $R5$ 、 $R6$ は特定化合物色素-3～色素-6についての式により示されるさまざまな置換基である。

#### 【0014】

本発明に従って、対イオンは、非限定的に、単一の元素又は負に荷電した基を含む。本発明の1の態様においては、上記対陰イオンは $Br^-$ 、 $Cl^-$ 又は $I^-$ から選ばれるハライドである。本発明の他の態様においては、上記対陰イオンはトシレート基( $OTs^-$ )であり、ここで $OTs^-$ は $[CH_3(C_6H_4)SO_3]^-$ である。本発明のさらなる他の態様においては、上記対陰イオンは $BF_4^-$ である。しかしながら、本発明はそのように限定されない。非限定的に、 $PF_6^-$ を含むこれらの既知のイオン及びイオン基から好適な対陰イオンを選択することは当業者の技術範囲内にある。

#### 【0015】

本発明は、赤色-励起可能又は青色-励起可能でありうる、上記に示される一般式を有する色素化合物を提供する。本明細書中に使用されるとき、赤色励起可能な色素は赤色スペクトル範囲における波長の光で照射されたとき蛍光を発する色素である。本明細書中で使用されるとき、この赤色スペクトル範囲は約600 nm～約725 nm、そして好ましくは630 nm～670 nmである。青色励起可能な色素は青色スペクトル範囲における波長の光を当てられたとき蛍光を発

する色素である。本明細書中で使用されるとき、青色励起可能な色素は典型的に420 nm～560 nm、そして好ましくは約450 nm～約520 nmの範囲で、吸収最大を有しうる。

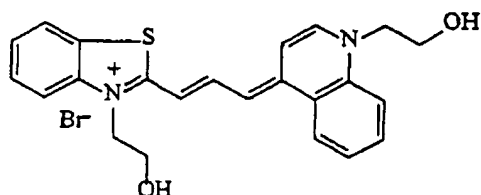
#### 【0016】

上記に示されるように、本発明に係る色素は核酸に結合したとき、蛍光の強い高まりを示す。一般的に、群Iの一般式の色素は約200超の蛍光の高まり率（遊離の色素の蛍光強度に対するRNA-結合した色素の蛍光強度の率）を有する。いくつかの態様においては、本発明に係る色素は約300超の蛍光高まり率を有する。本発明に係るさらに他の色素は約350超の蛍光高まり率を有するであろうが、本発明に係る他の色素は約400超の蛍光高まり率を有するであろう、そして本発明に係るさらに他の色素は約450超の蛍光高まり率を有するであろう。特定の例には、例えば、図（1B）及び表（1）を参照のこと。しかしながら、本発明は本明細書中に提供される率により限定されない。

#### 【0017】

1の所望される態様においては、本発明は、以下の式：

#### 【化10】

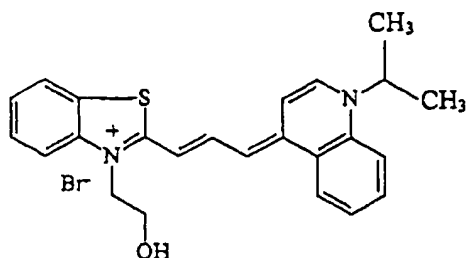


を有する、本明細書中でRetiCRed1と呼ばれる色素を提供する。RetiCRed1はさらに実施例（1A）、化合物（6）において示される。RetiCRed1における上記一般式について、nは1であり、R1はHであり、R2=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、XはSであり、そしてB<sup>-</sup>はBr<sup>-</sup>である。

【0018】

他の所望される態様においては、本発明は以下の式：

【化11】

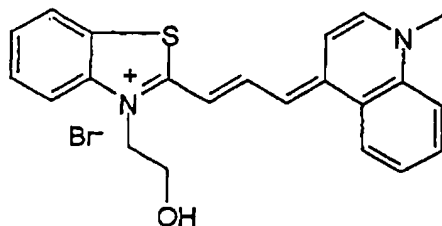


を有する、Retic Red 2と呼ばれる色素を提供する。Retic Red 2における上記一般式について、 $n$ は1であり、 $R_1$ はHであり、 $R$ は $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ であり、 $X$ はSであり、 $R_2$ は $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ であり、そして $\text{B}^-$ は $\text{Br}^-$ である。

【0019】

さらに他の所望される態様においては、本発明は以下の式：

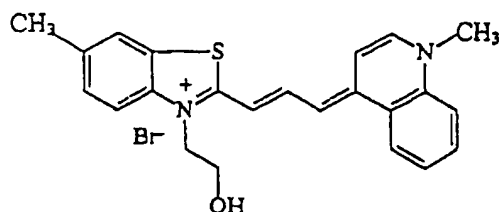
【化12】



を有する、Retic Red 3と呼ばれる色素を提供する。Retic Red 3における上記一般式について、 $n$ は1であり、 $R_1$ はHであり、 $R$ は $\text{CH}_3$ であり、 $R_2$ は $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ であり、 $X$ はSであり、そして $\text{B}^-$ は $\text{Br}^-$ である。

さらに他の所望される態様においては、本発明は以下の式：

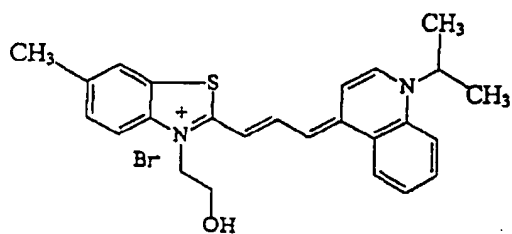
【化13】



を有する、Retic Red 4と呼ばれる色素を提供する。Retic Red 4における上記一般式について、 $n$ は1であり、 $R_1$ は $\text{CH}_3$ であり、 $R$ は $\text{CH}_3$ であり、 $R_2$ は $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ であり、 $X$ は $\text{S}$ であり、そして $\text{B}^-$ は $\text{Br}^-$ である。

さらなる態様においては、本発明は以下の式：

【化14】

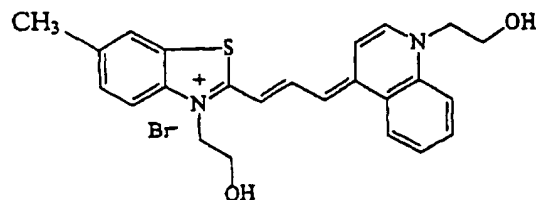


を有する、Retic Red 5と呼ばれる色素を提供する。Retic Red 5における上記一般式について、 $n$ は1であり、 $R_1$ は $\text{CH}_3$ であり、 $R$ は $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ であり、 $R_2$ は $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ であり、 $X$ は $\text{S}$ であり、そして $\text{B}^-$ は $\text{Br}^-$ である。

【0020】

他の所望される態様においては、本発明は以下の式：

【化15】



を有する、Retic Red 6と呼ばれる色素を提供する。Retic Red 6における上記一般式について、 $n$ は1であり、 $R_1$ は $\text{CH}_3$ であり、 $R$ は $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ であり、 $R_2$ は $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ であり、 $X$ は $\text{S}$ であり、そして $\text{B}^-$ は $\text{Br}^-$ である。

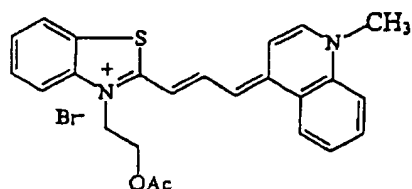
【0021】

さらに他の所望される態様においては、本発明はRetic Blue 1と呼ばれる青色一励起可能な色素を提供し、ここで一般式について、 $n$ は0である。好ましい青色励起可能な色素の1の特に所望される例は、上記一般式により示されるRetic Blue 1であり、ここで、 $n=0$ 、 $R_1=\text{H}$ 、 $m=1$ 、 $R_2=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $R=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $X=\text{S}$ 、 $\text{B}^-=\text{Br}^-$ である。

【0022】

1の所望されうる態様においては、本発明は以下の式：

【化16】

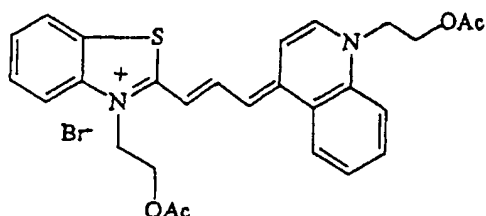


を有する、本明細書中で色素-1と呼ばれる色素を提供する。上記群 I I の一般式について、上記色素-1は  $n=1$  ;  $R_1=H$  ;  $R=CH_3$  ;  $R_2=CH_2CH_2OAc$  ;  $X=S$  ; 及び  $B^-$  は  $Br^-$  である、を有する。

【0023】

他の所望される態様においては、本発明は以下の式：

【化17】



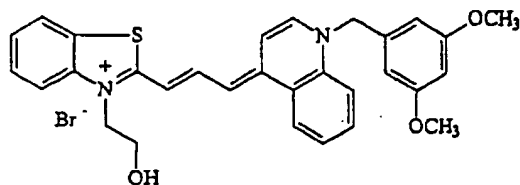
を有する、色素-2と呼ばれる色素を提供する。色素-2は実施例(1B)中でさらに示される。上記群 I I の一般式について、上記色素-2は  $n=1$  、  $R_1=H$  、  $R_2=R=CH_2CH_2OAc$  、  $X=S$  、 及び  $B^-$  は  $Br^-$  である、を有する。

【0024】

他の所望される態様においては、本発明は以下の式：

【化18】



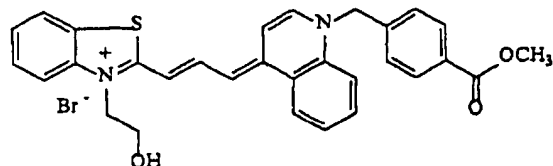


を有する、本明細書中で色素－３と呼ばれる色素を提供する。色素－３は実施例（１Ｃ）中でさらに示される。上記群ⅠⅠⅠの一般式について、上記色素－３は  $n = 1$ 、 $X$  は  $S$  であり、 $R_1 = H$ 、 $R_2 = CH_2CH_2OH$ 、 $R_3 = R_4 = OCH_3$ 、 $R_5 = R_6 = H$ 、及び  $B^-$  は  $Br^-$  である、を有する。

【００２５】

他の所望される態様においては、本発明は以下の式：

【化１９】

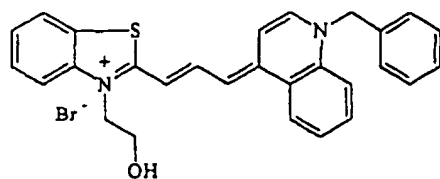


を有する、色素－４と呼ばれる色素を提供する。色素－４は実施例（１Ｃ）中でさらに示される。上記群ⅠⅠⅠの一般式について、上記色素－４は  $n = 1$ ； $X = S$ ； $R_1 = H$ ； $R_2 = CH_2CH_2OH$ ； $R_3 = R_5 = R_6 = H$ ； $R_4 = COCH_3$ ；及び  $B^-$  は  $Br^-$  である、を有する。

【００２６】

他の所望される態様においては、本発明は以下の式：

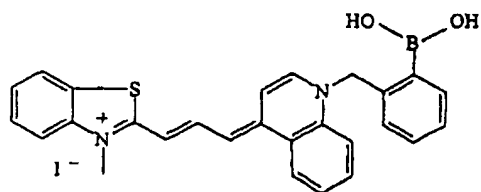
【化２０】



を有する、色素－５と呼ばれる色素を提供する。色素－５は実施例（１Ｃ）中でさらに示される。上記群ⅠⅠⅠの一般式について、上記色素－５は  $n = 1$  ;  $X = S$  ;  $R_1 = H$  ;  $R_2 = CH_2CH_2OH$  ;  $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$  ; 及び  $B^-$  は  $Br^-$  である、を有する。

さらに他の所望される態様においては、本発明は以下の式：

【化２１】



を有する、色素－６と呼ばれる色素を提供する。

色素－６は実施例（１Ｃ）中でさらに示される。上記群ⅠⅠⅠの一般式について、上記色素－６は  $n = 1$  ;  $X = S$  ;  $R_1 = H$  ;  $R_2 = CH_2CH_2OH$  ;  $R_3 = R_4 = R_5 = H$  ;  $R_6 = B(OH)_2$  ; 及び  $B^-$  は  $I^-$  である、を有する。

【００２７】

本発明に係る色素は当業者に容易に明らかであろうさまざまな目的に有用である。上記使用は、例えば、それらが結合される分子又は化合物の存在を検出するためのマーカー又はタグとしての色素の使用を含む。上記マーカーは i n v i

v oで治療用化合物の効率をモニターするために又は診断の使用等のために使用されうる。しかしながら、本発明に係る色素は特に核酸の染色によく合う。例えば、これらの色素は特に網状赤血球内のRNAの染色に好適である。他の例示的な使用においては、これらの色素は有核の赤血球においてDNAを染色するのに好適である。典型的に、核酸の染色において使用されるとき、上記色素は試薬溶液に調合される。

#### 【0028】

##### I. 染色試薬

本発明は、さまざまな分析フォーマットを含む、さまざまな使用における染色試薬として有用である、本明細書中に示されるさまざまな組成物を提供する。上記使用の例は、本明細書に示される組成物の総覧について、当業者に容易に明らかであろう。

#### 【0029】

##### A. 色素組成物

核酸の染色のための本発明に係る新規色素を利用するために、上記色素は溶液を形成するために好適な溶媒中に溶解される。本明細書中に示されるとき、溶媒は固体、液体又は気体を溶解しうるいかなる液体をも示すと意味される。本発明の好ましい態様は、ジメチルスルフォキシド(DMSO)、メタノール、エタノール、及びその混合物の如き、水に基づく又は混和性の液体を利用する。好適な溶媒の選択は、しかしながら、本発明の限定ではない。貯蔵のためには、典型的に比較的高い濃度の色素が貯蔵溶液を得るために好適な溶媒中に溶解される。好ましい態様においては、上記色素の貯蔵溶液を得るために、上記色素は0.5 mM~10 mM、そして最も好ましくは1~5 mMの範囲の色素濃度でDMSO中に溶解される。

#### 【0030】

本発明に係る方法における上記色素組成物のさらなる使用のためには、上記貯蔵溶液は、例えば、水、塩水、リン酸緩衝塩水(PBS)又は等張塩水を含む、他の試薬又は緩衝液中に希釈されうる。上記色素組成物中の最終的な色素濃度は上記使用に因り変動しうる。1の態様においては、全血のサンプルに添加される

最終的な色素組成物における上記色素の濃度は約0.1～50  $\mu$ M、好ましくは約0.5～25  $\mu$ M、そしてより好ましくは2～10  $\mu$ Mの範囲内である。しかしながら、好適な濃度又は希釈溶媒の選択は本発明における限定ではない。

#### 【0031】

本発明に係る色素組成物はさまざまな目的に利用されうる。本発明の好ましい態様は核酸の染色、検出、及び分析のための色素組成物の使用である。本発明の他の好ましい態様は全血における網状赤血球の染色、検出、及び分析のための上記色素組成物の使用である。本発明のさらに他の好ましい態様は全血における有核の赤血球の染色、検出、及び分析のための上記色素の使用である。当業者は本発明に係る上記色素及び試薬の使用は限定されないことを容易に理解するであろう。1の特定の所望される態様においては、例えば、上記色素は無傷の細胞に接触する場合、1以上の上記色素が混合物中に調合されることが所望されうる。

#### 【0032】

##### B. 速い染色のための組成物

他の局面においては、本発明に係る色素組成物は細胞膜を通る上記色素の速い移動を促進し、それにより色素が約1分間以内でも網状赤血球を染色するようにさせるために利用されうる。したがって、本発明に係る方法は約0～約60秒、好ましくは約0秒～約45秒、より好ましくは約0秒～約30秒、最も好ましくは約0秒～約20秒で染色させうる。

#### 【0033】

一般的に、上記速い染色は、サンプルが少なくとも1の界面活性剤、及び場合により、スルホン酸又はその塩の存在下で、本発明に係る色素組成物と接触されることを必要とする。

#### 【0034】

速い染色に使用されるとき、追加の成分が本発明に係る組成物に添加されうる。例えば、緩衝液は上記色素組成物のpHを維持することが必要である状況において使用されうる。好ましくは、上記色素試薬のpHは約6～約9の範囲内に維持される。より好ましくは、約7～約7.5の範囲のpHが得られる。上記緩衝液は、本発明に係る組成物において使用されるために、当業者に知られるさまざ

まな緩衝液から選ばれることができ、非限定的に、リン酸緩衝塩水（PBS）又はISOTON（商標）II希釈液、米国特許第3,962,125号、[Beckman Coulter, Inc., Miami, Florida]等の如き、等張塩水を含む。さらに、上記緩衝液は本発明に係る組成物の1以上の成分の濃度を調節するのにも使用されうる。保存料も本発明に係る組成物に添加されることができ、そして、非限定的に、5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン、及び2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンから選ばれうる[上記保存料は、例えば、ProClin 300又はProClin 150として商業的に購入されうる]。

#### 【0035】

少なくとも1の界面活性剤が速い染色組成物中で使用される。1の例示的な態様においては、上記界面活性剤は細胞の球状化剤として機能する洗剤及び第二の界面活性剤を含む。他の例示的な態様においては、上記界面活性剤は、単一の界面活性剤が洗剤及び球状化剤の両方として機能するように設計されうる。さらに他の例示的な態様においては、上記界面活性剤は、単一の界面活性剤が必要とされる界面活性剤機能を提供するが、球状化剤機能は必要とされないように設計されうる。

#### 【0036】

本発明に係る組成物において使用されるべき界面活性剤は、陰イオン界面活性剤アンモニウムペルフルオルアルキルカルボキシレート[Fluorad（商標）FC-143（3M Company, Minneapolis, Minnesota）として商業的に入手可能]、ラウロイルミリストイルラクチレートナトリウム[Pationic（商標）138C（R. I. T. A. Corp, Woodstock, Illinois）として商業的に入手可能]から又は非イオン性界面活性剤ドデシル- $\beta$ -D-マルトシド、N, N-ビス[3-D-グルコン-アミドプロピル]コールアミド、ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロック共重合体、N-テトラデシル- $\beta$ -D-マルトシド、ダコニル-N-メチル-グルカミド、n-ドデシル- $\beta$ -D-グルコピラノシド、n-デシル- $\beta$ -D-グルコピラノシド、ステアリン酸のポリエチレングリ

コールエステル、エトキシ化ココモノグリセリド、オクチフェノキシポリ（エチレンオキシ）エタノール、エトキシ化オクチルフェノール、及び直鎖アルコールから又は陽イオン性界面活性剤、ココヒドロキシエチルイミダゾリン、塩化ラウリルトリメチルアンモニウム、臭化デシルトリメチルアンモニウム、臭化オクチルトリメチルアンモニウムから又は双極性イオン性界面活性剤ラウルアミドプロピルベタイン、N-テトラデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネート、N-ドデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネート、ココアミドプロピルベタイン、ココアミドスルフォベタイン、N-ドデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネート、N-テトラデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネートから選ばれうる。

#### 【0037】

上記に議論されるように、上記選択される界面活性剤は、上記濃度及び容量オスモル濃度が好適に調節されるとき、赤血球細胞の球状化剤として機能しうる。球状化剤は当業者により容易に選択されうる。好ましい球状化試薬は、好適に溶液中でリン酸緩衝塩水の如き緩衝液を伴う、非イオン性界面活性剤ドデシル- $\beta$ -D-マルトシドに基づく。血液サンプル中の網状赤血球及び赤血球を有効に等体積的に球状化するために、上記組成物中の球状化試薬の濃度は約200～約400 mOsm、そして好ましくは約250 mOsm～約350 mOsmの範囲内のmOsmで、最も好ましくは約3  $\mu$ g/ml～約50  $\mu$ g/mlである。しかしながら、当業者はこの濃度及び容量オスモル濃度を、上記選択された界面活性剤を考慮に入れて、細胞を等体積的に球状化するように必要とされ又は所望されるように容易に調節しうる。上記に議論されるように、場合により上記球状化試薬の選択は上記洗剤の必要性を消去しうる。

#### 【0038】

1の態様においては、洗剤は本発明に係る色素組成物中に含まれる。使用されるべき洗剤は非イオン性洗剤から選ばれる。所望のように、これらの洗剤は約0～約1%の濃度で使用される。本発明の1の好ましい態様においては、上記洗剤は約0.001%～約0.5%の濃度で使用され、そしてより好ましい態様にお

いては、約0.005%~0.1%の範囲内である。1の今般の好ましい洗剤はオクチルフェノキシポリ(エチレンオキシ)エタノール[Igepal(商標)CA-630(Sigma N-6507)又はNonidet P-40(Sigma)として商業的に入手可能]である。他の好適な洗剤の例はエチオキシル化オクチルフェノール[Triton X-100(Sigma T9284)として商業的に入手可能]、及び直鎖アルコールアルコキシレート[Plurafac(商標)A-38(BASF Corp)又はPlurafac(商標)A-39(BASF Corp)として商業的に入手可能]を含む。典型的に、これらの洗剤はサンプル、例えば、1~2 $\mu$ lの全血等と混合される(又はその逆)、又は別々に本発明に係る組成物中に調合される。

#### 【0039】

1の所望されうる態様においては、スルホン酸又はその塩は本発明に係る組成物中に含まれる。上記スルホン酸又はその塩は上記色素組成物を細胞膜を通じて移動させるさらなる促進剤としてはたらき、そして約0.01~約250 $\mu$ M、より好ましくは約0.01~約50 $\mu$ Mの範囲の濃度で使用される。本発明の1の態様はp-トルエンスルホン酸を利用する。本発明の他の態様においては、p-トルエンスルホン酸塩はp-トルエンスルホン酸に置換されうる。上記塩の例はp-トルエンスルホン酸ナトリウム、カリウム、銀、亜鉛、及びバリウム塩を含む。上記塩のいくつかの例は、例えば、Sigma-Aldrichから、商業的に入手可能である。他の好適なスルホン酸は本発明における使用のために容易に選択されうる。

#### 【0040】

本発明に係る色素組成物は、場合により他の色素の存在下で、単一の色素を含みうる。本発明の1の態様においては、本発明に係る組成物は本発明に係る1以上の色素化合物又はその組み合わせを含みうる。

本発明のさらに他の態様においては、本発明に係る組成物は本発明に係る1以上の新規色素と共に当業者に知られる他の色素を含みうる。上記色素は公開された及び/又は商業的に入手可能である色素のうちから容易に選ばれる。例えば、Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, Cal

ifornia) のカタログを参照のこと。当業者に容易に明らかであろう、本発明に係る色素及び組成物のためのさまざまな使用がある。

#### 【0041】

本発明のさらに他の態様においては、本発明に係る組成物は、本発明に係る1以上の新規色素と共に、細胞内の特定の核酸又はタンパク質のブロッキング剤として本分野において知られる他の色素及び試薬を含みうる。上記ブロッキング剤は公開された及び／又は商業的に入手可能である色素及び試薬のうちから容易に選ばれる。例えば、Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, California) のカタログ又はMolecular Probes (Eugene, Oregon) のカタログを参照のこと。当業者に容易に明らかであろう、本発明に係る色素及び組成物のためのさまざまな使用がある。

#### 【0042】

### II. 本発明に係る色素を用いた核酸染色法

本発明に係る色素組成物は、DNA及びRNAを含む、さまざまな核酸の染色において有用である。

遊離の核酸、例えば、細胞又は非細胞源の無傷の細胞膜により囲まれていない核酸を含むサンプルにおいては、本発明に係る色素組成物は上記核酸を染色する。本発明の1の態様においては、方法は核酸を含むサンプルを本発明に係る色素組成物と接触させるために提供される。好ましくは、上記方法は核酸を含むサンプルを、場合により当業者に知られる他の色素及び試薬の存在下で、本発明に係る色素組成物と接触させることを含む。本発明の好ましい態様においては、上記方法は核酸を含むサンプルを、約2～約10  $\mu$ Mの赤色励起可能なRetic Red 1色素及び等張水性緩衝液を含む、本発明に係る色素組成物と接触させることを含む。本発明の他の好ましい態様においては、上記方法は核酸を含むサンプルを、約1～約10  $\mu$ Mの赤色励起可能な色素-1、色素-2、色素-3又はそれらの組み合わせ及び等張水性緩衝液を含む、本発明に係る色素組成物と接触させることを含む。

本発明に係る色素組成物はRNAを含む網状赤血球の検出及び計測における使



用に特によく合う。本発明に係る方法は、それゆえ、核酸を含む網状赤血球を1以上の本発明に係る色素組成物と接触させることを含む。

【0043】

本発明に係る色素組成物、好ましくは群ⅠⅠ及び群ⅠⅠⅠは、DNAを含む有核の赤血球の検出及び計測における使用によく合う。

【0044】

1の態様においては、上記方法は上記血液細胞を、少なくとも1の界面活性剤の存在下で、場合により保存剤及びスルホン酸試薬と共に、本発明に係る色素組成物と接触させることを含む。上記に示すように、界面活性剤は洗剤及び／又は球状化剤を含みうる。本発明に係る方法に従って、上記細胞はこれらの成分を含む組成物と接触されうる。あるいは、1以上のこれらの成分は、例えば、上記成分を上記サンプルに直接添加することにより、別々にデリバリーされうる。上記混合物はその後好適な時間インキュベートされる。以前に議論したように、上記インキュベーション時間は1分以内であろう。しかしながら、便利の目的のために所望される場合、上記インキュベーション時間は延長又は短縮されうる。例えば、上記色素、界面活性剤又は洗剤の濃度を調節することにより、上記インキュベーション時間は1分間以上に増加されうる。所望のように、この混合及びインキュベーションは約20℃～40℃の温度で行われうる。しかしながら、本発明の好ましい態様においては、22℃～28℃の範囲の温度が利用されうる。

【0045】

今般の好ましい態様においては、本発明に係る方法は、網状赤血球を染色するために、約0秒間～約1分間の範囲の期間の上記色素のインキュベーション時間を必要とし、そして上記染色は室温で達成されうる。他の好ましい態様においては、インキュベーション時間は上記血液サンプルは上記色素組成物と混合され、そしてその後即座に上記器具により分析されるため、消去される。例えば、実施例(5)、図(7)及び図(8)並びに実施例(7)、図(10A)～(2B)、(11A)～(11C)、(12A)～(12C)を参照のこと。この時間枠内における網状赤血球の赤色一励起可能な色素を用いた前人工染色技術は高温でのインキュベーション及び／又は毒性イオノフォア化合物の追加の使用を必要と

する。

【0046】

本発明に係る方法に従って、上記色素組成物で染色された網状赤血球は自動流動細胞光度測定器で好ましく計測される。しかしながら、これらの細胞は手動の手順又は自動化された光学顕微鏡によっても計測されうる。

【0047】

したがって、本発明に係る方法は、自動化された流動細胞光度測定法に所望される時間枠内で細胞膜を介する本発明に係る核酸特異的色素の移動を促進する。自動流動細胞光度測定器は本分野において周知であり、そして本発明は特定のどの流動細胞光度測定器の使用にも限定されない。本発明の好ましい態様はXL（商標）流動細胞光度測定器 [Beckman Coulter Inc., Miami, Florida] を用いた網状赤血球の検出及び計測を含む。異なる分析技術は、非限定的に、光分散、蛍光、光学吸収、軸光損失、DC電気インピーダンス、及び無線周波数（RF）伝導性を含む、流動細胞光度測定法による網状赤血球の計測において使用されうる。本発明の好ましい態様においては、上記流動細胞光度測定器を用いて、光分散ゲートが赤血球を単離するために使用され、そして蛍光ゲートがその後成熟赤血球から網状赤血球を線引きし、そして上記網状赤血球を計測するのに使用される。本発明の他の態様においては、流動細胞光度測定器を用いて、DC及び光分散ゲートが赤血球を単離するために使用され、そして蛍光ゲートがその後成熟赤血球から網状赤血球を線引きし、そして上記網状赤血球を計測するのに使用される。本発明のさらに他の態様においては、流動細胞光度測定器を用いて、DC及び蛍光計測のみが成熟赤血球から網状赤血球を線引きし、そして上記網状赤血球を計測するのに使用される。

【0048】

本発明の好ましい態様の他の注目に値する利点は上記組成物が、Retic Red 1、Retic Red 3、色素-1、色素-2又は色素-3の如き、本発明に係る赤色-励起可能な色素を含むとき、それはCPO、AO [Seligman, Am. J. Hematology, 14:5791983)、T O [Lee et. al., Cytometry, 7:508 (1986

)]、Auramine-O及びPyronin-Yの如き他の現在入手可能な網状赤血球色素に使用されるアルゴンレーザーよりも費用のかからない励起源の使用を許す。例えば、本発明に係る上記赤色-励起可能な色素組成物が使用されるとき、本発明は都合のよいことに上記励起源として赤色レーザーの使用を許す。特に、赤色ダイオードレーザー、強力発光ダイオード(LED)又は赤色ヘリウムネオンレーザーは本発明に係る赤色-励起可能な色素を用いた網状赤血球計測を行うのに使用されうる。

#### 【0049】

上記流動細胞光度測定器のために励起源として利用されうる、さまざまなレーザーが当業者に知られる。上記レーザーは、網状赤血球の検出に選択される本発明に係る色素の励起波長に因り、非限定的に、アルゴン、ヘリウムネオン、ダイオード、及びダイオード駆動固体-状態レーザーから選ばれうる。好適な光源、及び好適な励起波長の選択は本発明上の限定ではない。

#### 【0050】

好適な励起波長は当業者により容易に決定されうる。赤色スペクトル範囲内の好適な励起波長の例は600nm~725nm、そして好ましくは630nm~670nmの範囲内のものを含む。他の好適な励起源及び波長は、本発明に係る方法及び組成物における使用のために選択される上記色素を考慮に入れて、当業者により容易に選択されうる。ReticRed1、ReticRed2、ReticRed3、ReticRed4、ReticRed5、ReticRed6、色素-1、色素-2又は色素-3等の如き、本発明に係る赤色-励起可能な色素化合物が本質的に核酸の非存在下(結合していない状態)では水性溶液中で非蛍光又は非常に弱い蛍光であるという事実から追加の利点が起こる。その結果、バックグラウンド蛍光に関連する問題は最小で、そして網状赤血球はこの色素を用いて高感度で検出されうる。

したがって、本発明は、次に続く流動分析のために、網状赤血球が本発明に係る色素で速く染色されることを許す。本発明に係る方法は上記細胞の固定を必要とする前人工Pyronin-Y[上記に引用される、Tanke et al.]染色手順及び細胞-固定は必要としないが、染色を達成するために上記血液

との長いインキュベーションを必要とするCPO (reticONE (商標))  
又はチアゾールオレンジ (Retic-Count (商標)) の如き膜透過性色  
素に関連する前人工蛍光染色手順のどちらとも異なる。

【0051】

### III. 実施例

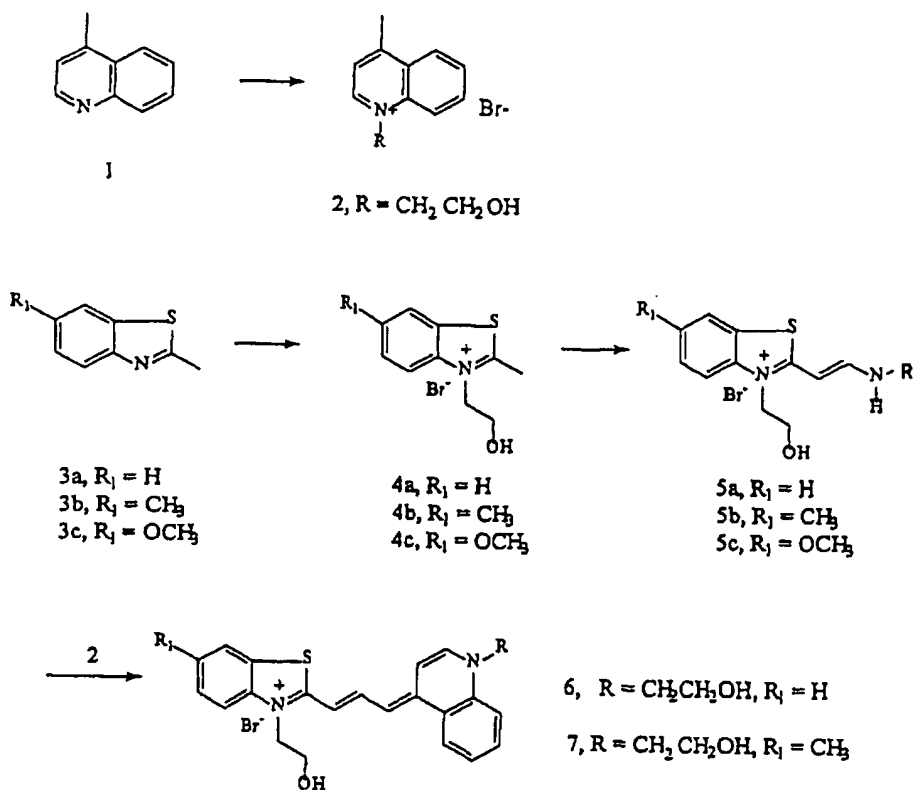
以下の実施例は本発明を例示するために提供され、そしてその範囲を限定しな  
い。当業者は特定の試薬及び状態が以下の実施例中に概略されているが、本発明  
の精神及び範囲により含まれるように意味される改変がなされうることを理解す  
るであろう。

【0052】

### 実施例(1A) - 群Iの化合物の合成用材料及び方法

【化22】

## A. グループ I に関する一般染料合成



【0053】

## B. 特定色素の調製

臭化1-(2-ヒドロキシ)エチルエピジニウムの調製。レピジン (11.5 g) 及びプロモエタノール (100 g) の溶液を攪拌し、そして110℃の油浴中で48時間熱した。上記反応混合物を室温まで冷却し、酢酸エチル (100 ml) を添加し、そして5分間攪拌して、固体を生じ、それを回収し、酢酸エチル (2×20 ml) で洗浄し、そして乾燥させた。上記固体をその後メタノール (80 ml) 中に溶解し、そして酢酸エチル (600 ml) で沈殿した。上記固体をろ過を介して回収し、酢酸エチル (2×100 ml) で洗浄し、そして高い吸引下で50℃のオープン内で一晩乾燥させ、11.47 g (53%収率) の生成

物(2c)を得た。

【0054】

臭化3-(2-ヒドロキシ)エチル-2-メチルベンゾチアゾリウム(4a)  
の調製。2-メチルベンゾチアゾール(5.87g)及び2-ブロモエタノール  
(49.2g)の溶液を攪拌し、そして110℃の油浴中で18時間熱した。上記  
反応混合物を室温まで冷却した後、酢酸エチル(100ml)を添加し、そして  
デカントし、生ずる固体をその後メタノール(50ml)中に溶解し、そして酢  
酸エチル(300ml)で沈殿させた。上記固体をメタノール及び酢酸エチルの  
混合物から再び再結晶し、酢酸エチル(2×25ml)で洗浄し、そして高い吸  
引下で50℃のオープン内で一晩乾燥させ、4.21g(39%)の4aを得た。  
。

【0055】

臭化3-(2-ヒドロキシ)エチル-2,6-ジメチルベンゾチアゾリウム(4b)  
の調製。2,6-ジメチルベンゾチアゾール(13.0g)及び2-ブロ  
モエタノール(100g)の溶液を攪拌し、そして120℃まで96時間油浴中  
で熱した。上記混合物を室温まで冷却した後、酢酸エチル(150ml)を添加  
し、そして1時間攪拌して、生ずる固体をろ過し、そして回収した。上記固体を  
その後メタノール(150ml)中へ溶解し、そして木炭(2g)を添加した。  
上記木炭をCelite(商標)のパッドを通すことにより除去した。上記溶液  
をその後小体積まで濃縮し、そしてアセトン(200ml)で粉碎した。上記固  
体を回収し、アセトン(2×30ml)、酢酸エチル(2×30ml)で洗浄し  
、そして高い吸引下で50℃のオープン内で一晩乾燥させ、13.95g(61  
%)の4bを得た。

【0056】

臭化3-(2-ヒドロキシ)エチル-6-メトキシ-2-メチルベンゾチアゾ  
リウム(4c)の調製。6-メトキシ-2-メチルベンゾチアゾール(1.82  
g)及び2-ブロモエタノール(8.8g)の溶液を攪拌し、そして120℃の  
油浴中で74時間熱した。上記反応混合物を室温まで冷却後、酢酸エチル(25  
ml)を添加し、そして1時間攪拌し、上記固体をろ過して、そして回収した。

上記固体をその後メタノール（50 ml）中に溶解し、そして木炭（0.5 g）を添加した。上記木炭をCelite（商標）のパッドを通すことにより除去した。上記溶液をその後小体積まで濃縮し、そして酢酸エチル（100 ml）で粉碎した。上記固体を回収し、酢酸エチル（2×30 ml）で洗浄し、そして高い吸引下で50℃のオープン内で一晩乾燥させ、0.9 g（30%）の4cを得た。

#### 【0057】

臭化3-（2-ヒドロキシ）エチル-2-（2-N-フェニル）エテニルベンゾチアゾリウム（5a）の調製。メタノール／エタノール（3：1、80 ml）の混合した溶媒中の臭化3-（2-ヒドロキシ）エチル-2-メチルベンゾチアゾリウム（4a、1.19 g）の溶液に過剰のエチルN-フェニルフォルムイミデート（3.0 g）を添加し、そして上記溶液を室温で36時間攪拌した。上記溶媒を減圧下で除去し、乾燥した固体を得た。上記固体をカラムクロマトグラフィー（シリカゲル、塩化メチレン／メタノール）精製にかけた。上記生成物を含む画分を混合し、そして減圧下で乾燥するまで濃縮した。上記固体をメタノール（10 ml）中に溶解し、そしてエチルエーテル（200 ml）で沈殿した。50℃で高い吸引下で一晩乾燥させた後、1.04 g（63%）の5aを黄色固体として得た。

#### 【0058】

臭化3-（2-ヒドロキシ）エチル-6-メチル-2-（2-N-フェニル）エテニルベンゾチアゾリウム（5b）の調製。メタノール（80 ml）中の臭化3-（2-ヒドロキシ）エチル-2,6-ジメチルベンゾチアゾリウムの溶液に過剰のエチルN-フェニルフォルムイミデート（3.6 g）を添加し、そして上記溶液を室温で36時間攪拌した。酢酸エチル（160 ml）をその後添加し、そして一晩攪拌した。上記固体を回収し、酢酸エチル（2×30 ml）で洗浄し、そして乾燥させた。上記固体を50℃のオープン内で高い吸引下で一晩さらに乾燥させ、2.32 g（62%）の5bを黄色固体として得た。

#### 【0059】

臭化3-（2-ヒドロキシ）エチル-6-メトキシ-2-（2-N-フェニル

）エテニルベンゾチアゾリウム（5c）の調製。メタノール（30ml）中の臭化3-（2-ヒドロキシ）エチル-6-メトキシ-2-メチルベンゾチアゾリウムの溶液に過剰のエチルN-フェニルフォルムイミデート（1.5g）を添加し、そして上記溶液を室温で16時間攪拌した。上記溶媒を減圧下で除去し、乾燥した固体を作出した。上記固体をカラムクロマトグラフィー（シリカゲル）にかけ、そしてメタノール／塩化メチレン勾配（0～15%メタノール）で溶出した。上記生成物を含む画分を混合し、そして減圧下で乾燥するまで濃縮した。上記固体をメタノール（5ml）中に溶解し、そしてエチルエーテル（150ml）で沈殿させた。50℃のオープン内で高い吸引下で一晩乾燥させた後、0.35g（33%）の5cを黄色固体として得た。

【0060】

色素化合物6（Reti c Red 1）の調製。塩化メチレン（20ml）中の臭化3-（2-ヒドロキシ）エチル-2-（2-N-フェニル）エテニルベンゾチアゾリウム（5a、85.8mg）及び臭化1-（2-ヒドロキシ）エチルレピジニウム（2、58.4mg）の溶液にトリエチルアミン（91μL）及び酢酸無水物（62μL）を添加した。室温で2時間攪拌後、上記溶媒を減圧下で除去し、青色固体を得た。上記固体をメタノール（15ml）中に部分的に再溶解し、そして酢酸エチル（300ml）を添加した。生ずる固体をろ過を介して回収し、酢酸エチル（2×30ml）で洗浄し、そして乾燥させた。上記固体を50℃のオープン内で高い吸引下で一晩さらに乾燥させた後、67.8mg（66%）の8を青色固体として得た。最大吸収スペクトル：630nm（メタノール中）、640nm（DMSO中）。

【0061】

色素化合物7（Reti c Red 6）の調製。塩化メチレン（10ml）中の臭化3-（2-ヒドロキシ）エチル-6-メチル-2-（2-N-フェニル）エテニルベンゾチアゾリウム（5b、85.6mg）、臭化1-（2-ヒドロキシ）エチルレピジニウム（2、58.7mg）、及びメタノール（1.0ml）の溶液に、トリエチルアミン（91μL）及び酢酸無水物（61μL）を添加した。室温で2時間攪拌した後、上記溶媒を減圧下で除去し、青色固体を得た。上記

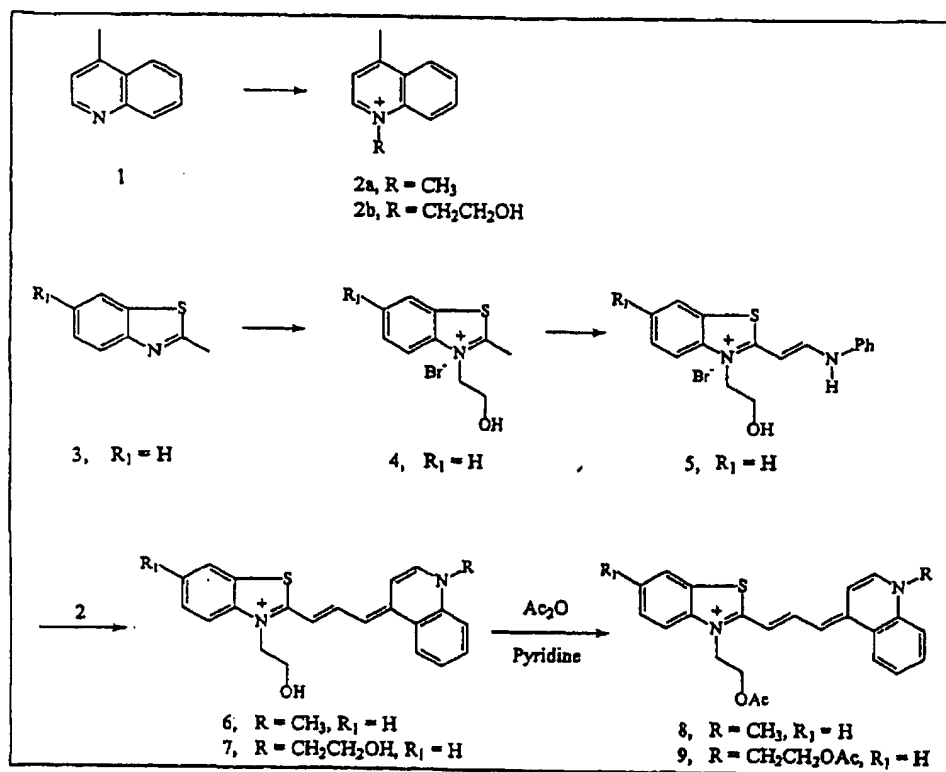


固体を部分的にメタノール（10 ml）中に再溶解し、そして酢酸エチル（200 ml）を添加した。生ずる固体をろ過を介して回収し、酢酸エチル（2×30 ml）で洗浄し、そして乾燥させた。上記固体を50℃のオープン内で高い吸引下で一晩さらに乾燥させ、63.7 mg（60%）の11を青色固体として得た。最大吸収スペクトル：636 nm（メタノール中）、645 nm（DMSO中）。

実施例1B：群-I I化合物の合成用材料及び方法

【化23】

合成計画



【0062】

(i) ヨー化1-メチルレピジニウム（2a）の調製。レピジン（10.56 g）及びヨー化メチル（105 g）の溶液を攪拌し、そして50℃の油浴中で1

9時間還流まで熱した。上記反応混合物を室温まで冷却し、アセトン(200 mL)を添加し、そして2時間攪拌した。生ずる固体を回収し、酢酸エチル(2×20 mL)で洗浄し、そしてその後酢酸エチル(200 mL)で粉碎した。上記固体をろ過を介して回収し、酢酸エチル(2×25 mL)で洗浄し、そして50℃のオープン内で高い吸引下で一晩乾燥させた。20.74 g (98.6%収率)の生成物を得た。

【0063】

(ii) 臭化1-(2-ヒドロキシエチル)レピジニウム(2b)の調製。レピジン(11.5 g)及びプロモエタノール(100 g)の溶液を110℃の油浴中で48時間攪拌した。上記反応混合物を室温まで冷却し、酢酸エチル(100 mL)を添加し、そして5分間攪拌した。生ずる固体を回収し、酢酸エチル(2×20 mL)で洗浄し、そして乾燥させた。上記固体をその後メタノール(80 mL)中に溶解し、そして酢酸エチル(600 mL)で沈殿させた。上記固体をろ過を介して回収し、酢酸エチル(2×100 mL)で洗浄し、そして50℃のオープン内で高い吸引下で一晩乾燥させた。11.47 g (53%収率)の生成物を得た。

【0064】

(iii) 臭化3-(2-ヒドロキシエチル)-2-メチルベンゾチアゾリウム(4)の調製。5.87 gの2-メチルベンゾチアゾール(3)及びプロモエタノール(49.2 g)の溶液を110℃の油浴中で18時間攪拌した。酢酸エチル(100 mL)を上記反応混合物に添加し、そしてデカントした。上記残留固体をその後メタノール(50 mL)中に溶解し、そして酢酸エチル(300 mL)で沈殿させた。上記固体をメタノール-酢酸エチル(15 mL/150 mL)から再び再結晶させ、酢酸エチル(2×25 mL)で洗浄し、そして50℃のオープン内で高い吸引下で一晩乾燥させた。上記収率は4.21 g (39%)であった。TLC(シリカゲル、4:1 塩化メチレン:メタノール)  $R_f = 0.34$ 。

【0065】

(iv) 臭化3-(2-ヒドロキシエチル)-2-(2-N-フェニル)エテ

ニルベンゾチアゾリウム (5) の調製。メタノール／エタノール (3 : 1、80 mL) の混合された溶媒中の臭化 3 - (2 - ヒドロキシエチル) - 2 - メチルベンゾチアゾリウム (4、1.19 g) の溶液に過剰のエチル N - フェニルフォルミジエート (3.0 g) を添加し、そして室温で 36 時間攪拌した。上記溶媒を減圧下で蒸発させ、乾燥させた。上記固体をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、塩化メチレン／メタノール) 精製にかけた。上記生成物を含む画分を混合し、そして減圧下で乾燥するまで濃縮した。上記固体をメタノール (10 mL) 中に溶解し、そしてエチルエーテル (200 mL) で沈殿させた。50℃のオープン内で高い吸引下で一晩乾燥させた後、1.04 g (63%) の黄色固体を得た。TLC (シリカゲル、9 : 1 塩化メチレン／メタノール)  $R_f = 0.27$ 。

#### 【0066】

(v)  $R = CH_3$ 、 $R1 = H$  を有する、上記図において 6 として示される配置と一致する色素化合物の調製。ピリジン (10 mL) 中の臭化 3 - (2 - ヒドロキシエチル) - 2 - (2 - N - フェニル) エチルニルベンゾチアゾリウム (5、203.8 g) 及びヨー化 1 - メチルレピジニウム (2a、154.0 mg) の溶液を 90℃の油浴中で 2 時間無水条件下で熱した。DMF (0.5 mL) 中のテトラフルオロホウ酸ナトリウム (59.3 mg) の溶液を添加し、そして上記加熱をさらに 20 分間 90℃で続けた。室温まで冷却後、上記反応溶液を酢酸エチル (100 mL) 中に注ぎ、そして生ずる固体をろ過を介して回収した。上記固体をメタノール (100 mL) 中に再溶解し、そして酢酸エチル (300 mL) を添加し、そして一晩攪拌した。生ずる固体をろ過を介して回収し、酢酸エチル (2 × 20 mL) で洗浄し、そして乾燥させた。上記固体を 50℃のオープン内で高い吸引下で一晩さらに乾燥させ、165.4 mg (68%) の青色固体を得た。TLC (シリカゲル、4 : 1 塩化メチレン : メタノール)  $R_f = 0.65$ 。最大吸収 : 629 nm (メタノール中)。

#### 【0067】

(vi)  $R = CH_2CH_2(OH)$ 、 $R1 = H$  を有する、7 として示される配置と一致する色素化合物の調整。塩化メチレン (20 mL) 中の臭化 3 - (2 -

ヒドロキシエチル) - 2 - (2-N-フェニル) エテニルベンゾチアゾリウム (5、85.8 mg) 及び臭化1-(2-ヒドロキシエチル) レビジニウム (2b、58.4 mg) の溶液にトリエチルアミン (91  $\mu$ L) 及び酢酸無水物 (62  $\mu$ L) を添加した。室温で2時間攪拌後、上記溶媒を減圧下で蒸発させ、青色固体を得た。部分的に上記固体をメタノール (15 mL) 中に再溶解し、そして酢酸エチル (300 mL) を添加した。生ずる固体をろ過を介して回収し、酢酸エチル (2  $\times$  30 mL) で洗浄し、そして乾燥させた。上記固体を50℃のオープン内で高い吸引下で一晩さらに乾燥させ、67.8 mg (66%) の青色固体を得た。TLC (シリカゲル、4:1 塩化メチレン:メタノール)  $R_f$  = 0.18。最大吸収: 631 nm (メタノール中)。

#### 【0068】

(vii) 8として示される分子配置と一致するアセチル化色素化合物の調製。酢酸無水物 (4 mL) 及びピリジン (1 mL) 中の上記 (v) 中に示される色素化合物 (50 mg) の懸濁物を油浴中で無水条件下で10時間攪拌しながら50℃で熱した。室温まで冷却後、上記反応溶液を酢酸エチル (100 mL) 中に注ぎ、そして3分間攪拌した。生ずる細かい結晶をろ過を介して回収し、酢酸エチル (2  $\times$  20 mL) で洗浄し、そして50℃のオープン内で高い吸引下で一晩乾燥させた。56.5 mg (定量的な収率) の青色結晶固体生成物を得た。TLC (シリカゲル、4:1 塩化メチレン:メタノール)  $R_f$  = 0.79 最大吸収: 625 nm (メタノール中)。この化合物は本明細書中後に色素-1として示される。

#### 【0069】

(viii) 9として示される上記分子配置と一致するアセチル化色素化合物の調製。酢酸無水物 (8 mL) 及びピリジン (2 mL) 中の上記 (vi) 中に示される色素化合物 (377.5 mg) の懸濁物を油浴中で無水条件下で10時間攪拌しながら50℃で熱した。室温まで冷却後、上記反応溶液を酢酸エチル (100 mL) 中に注ぎ、そして3分間攪拌した。生ずる固体をろ過を介して回収し、酢酸エチル (2  $\times$  20 mL)、エチルエーテル (2  $\times$  20 mL) で洗浄し、そして50℃のオープン内で高い吸引下で一晩乾燥させた。411.9 mg (92

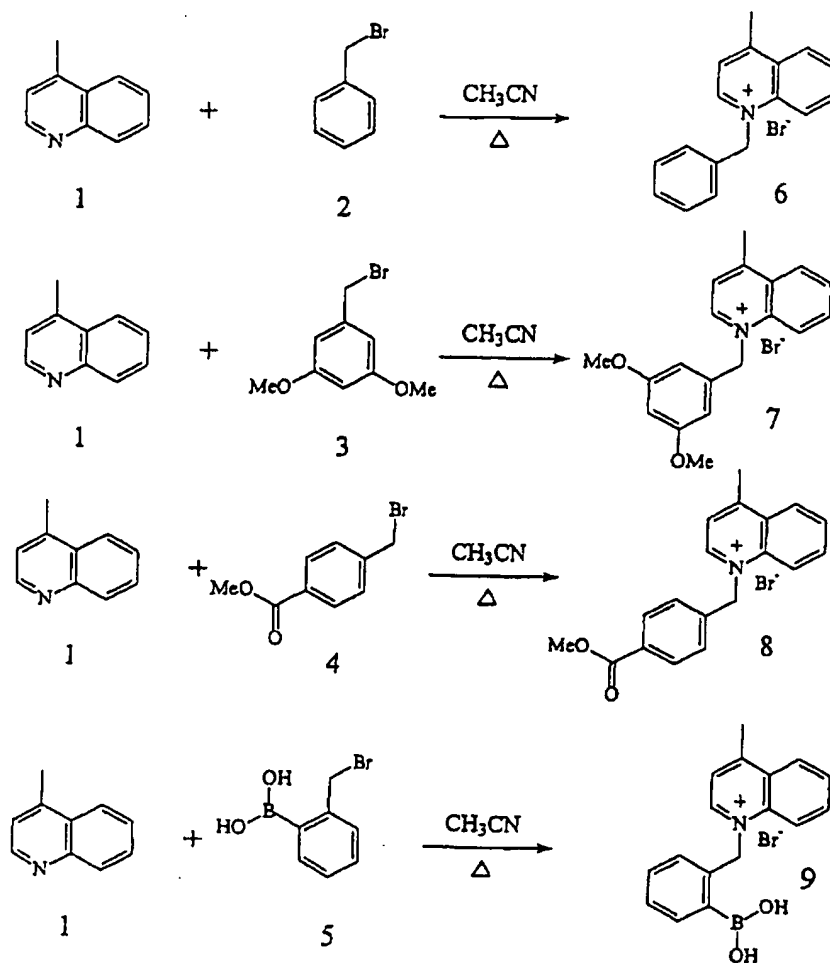
、6%収率)の青色固体生成物を得た。TLC(シリカゲル、4:1 塩化メチレン:メタノール)  $R_f = 0.96$ 。最大吸収:631nm(メタノール中)。この化合物は本明細書中後に色素-2として示される。

【0070】

実施例(1C) - 群III化合物の合成材料及び方法

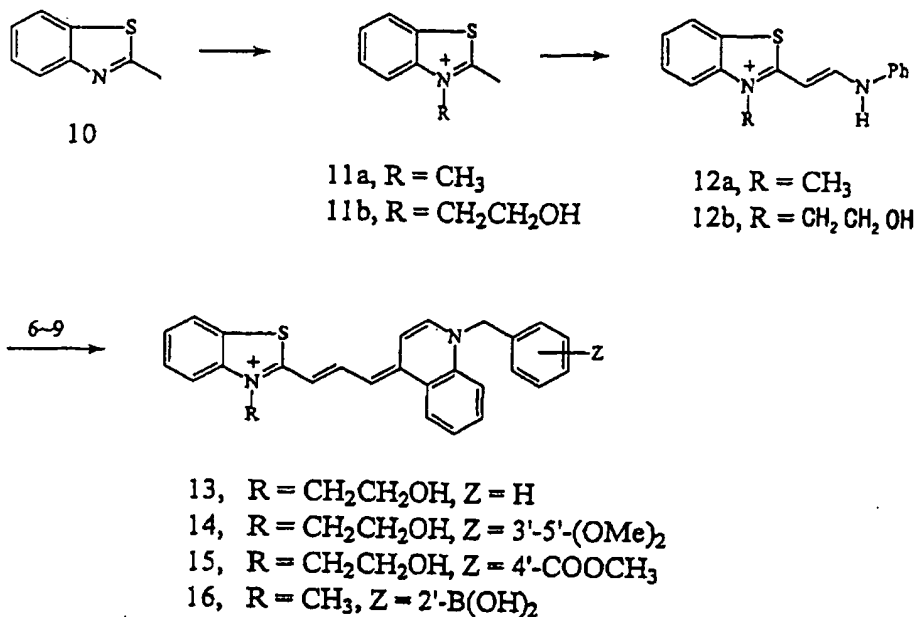
【化24】

合成計画1.



## 【化25】

## 合成計画II.



## 【0071】

2-ブロモメチルフェニルホウ酸(5)の調製。テトラ塩化炭素(1000mL)中の2-メチルフェニルホウ酸(10.65g)、N-ブロモスクシンイミド(NBS、16.86g)及び2,2'-アゾビスイソブチロニトリル(AIBN、1.708g)の懸濁物を82℃の油浴中で還流まで2時間無水条件下で熱した。上記反応混合物を室温まで冷却し、そして上記固体をろ過した。水(2×200mL)でろ過物を抽出した。上記有機層を分離し、MgSO<sub>4</sub>上で乾燥させ、そしてin vacuoで乾燥するまで濃縮した。上記固体をメタノール(100mL)中に再溶解し、そして酢酸エチル(1000mL)をそれに添加した。生ずる沈殿物を回収し、酢酸エチル(2×50mL)で洗浄し、そして風乾した。上記ろ過物を小体積まで濃縮し、そして固体の第二収穫物も回収した。上記混合された固体を50℃のオープン内で高い吸引下で一晩乾燥させた。6.

48 g (39%) の生成物を得た。

【0072】

臭化1-ベンジルレピジニウム (6) の調整。アセトニトリル (100 mL) 中のレピジン (37.82 g) 及び臭化ベンジル (6.471 g) の溶液を攪拌し、そして93℃の油浴中で20時間還流まで熱した。上記反応混合物を室温まで冷却し、酢酸エチル (50 mL) を添加し、そして30分間攪拌した。生ずる固体を回収し、酢酸エチル (4×20 mL) で洗浄し、そして風乾した。上記ろ過物を小体積まで濃縮し、そして固体の第二の収穫物も回収した。上記混合された固体を50℃のオープン内で高い吸引下で一晩乾燥させた。11.52 g (96.9%) の生成物を得た。

【0073】

臭化1-(3'-5'-ジメトキシベンジル) レピジニウム (7) の調製。アセトニトリル (100 mL) 中のレピジン (3.36 g) 及び臭化3,5-ジメトキシベンジル (5.41 g) の溶液を攪拌し、そして90℃の油浴中で30時間還流まで熱した。上記反応混合物を室温まで冷却し、酢酸エチル (50 mL) を添加し、そして30分間攪拌した。生ずる固体を回収し、酢酸エチル (4×20 mL) で洗浄し、そして風乾した。上記固体をメタノール (200 mL) 中に再溶解し、そして木炭 (5 g) で処理し、そして還流まで15分間熱して濃い色の不純物を除去した。Celite (商標) のパッドを通してろ過した後、上記ろ過物を小体積 (~20 mL) まで濃縮し、そして酢酸エチル (300 mL) を添加した。生ずる沈殿物を回収し、酢酸エチル (2×50 mL)、エチルエーテル (2×20 mL) で洗浄し、そして風乾した。50℃のオープン内で高い吸引下で一晩さらに乾燥させ、6.65 g (76%) の生成物を得た。

【0074】

臭化1-(4'-カルボキシメチルベンジル) レピジニウム (8) の調製。アセトニトリル (100 mL) 中のレピジン (3.32 g) 及びメチル4-(プロモメチル) ベンゾエート (5.31 g) の溶液を攪拌し、そして90℃の油浴中で還流まで16時間熱した。室温まで冷却後、上記溶媒を減圧下で乾燥するまで蒸発させた。生ずる固体を酢酸エチル (3×100 mL) で洗浄した。上記固体

をメタノール（100 mL）中に再溶解し、そして木炭（5 g）で処理し、そして還流まで15分間熱して濃い色の不純物を除去した。Celite（商標）のパッドを通してろ過した後、上記ろ過物を乾燥するまで濃縮した。上記固体をその後アセトン（100 mL）で粉碎した。生ずる固体を回収し、酢酸エチル（2×50 mL）で洗浄し、そして風乾した。上記ろ過物を小体積まで濃縮し、そして固体の第二の収穫物も回収した。上記混合された固体を50℃のオープン内で高い吸引下で一晩乾燥させた。7.26 g（84%）の生成物を得た。

【0075】

臭化1-(2'-ボロン酸)ベンジルレピジニウム(9)の調製。アセトニトリル（12 mL）中のレピジン（306 mg）及び2-ブロモメチルフェニルボロン酸（417 mg）の溶液を攪拌し、そして90℃の油浴中で還流まで17時間熱した。室温まで冷却後、上記溶媒を減圧下で乾燥するまで蒸発させた。上記固体を酢酸エチル（3×20 mL）で洗浄し、そして上記溶媒をデカントした。上記固体をメタノール（3 mL）中に再溶解し、そして再び乾燥するまで濃縮した。上記固体を酢酸エチル（3×20 mL）で洗浄した。上記固体をその後50℃のオープン内で高い吸引下で一晩乾燥させた。650 mg（93.5%）の生成物を得た。

【0076】

ヨ化2,3-ジメチルベンゾチアゾリウム(11a)の調製。2-メチルベンゾチアゾール（5.00 g）及びヨードメタン（50 g）の溶液を45℃の油浴中で44時間攪拌した。室温まで冷却後、上記固体をろ過を通して回収し、そして上記固体を酢酸エチル（2×100 mL）で洗浄し、そして50℃のオープン内で高い吸引下で一晩乾燥させた。8.02 g（82.3%収率）の生成物を得た。

【0077】

臭化3-(2-ヒドロキシ)エチル-2-メチルベンゾチアゾリウム(11b)の調製。2-メチルベンゾチアゾール（5.87 g）及びプロモエタノール（49.2 g）の溶液を110℃の油浴中で18時間攪拌した。酢酸エチル（100 mL）を上記反応混合物に添加し、そしてデカントした。上記残留の固体をそ



の後メタノール (50 mL) 中に溶解し、そして酢酸エチル (300 mL) で沈殿させた。上記固体を再びメタノール-酢酸エチル (15 mL / 150 mL) から再結晶化し、酢酸エチル (2 × 25 mL) で洗浄し、そして50℃のオープン内で高い吸引下で一晩乾燥させた。上記収率は4.21 g (39%) であった。TLC (シリカゲル、4 : 1 塩化メチレン-メタノール)  $R_f = 0.34$ 。

## 【0078】

ヨ-化3-メチル-2-(2-N-フェニル)エテニルベンゾチアゾリウム (12a) の調製。エタノール (30 mL) 中の臭化2,3-ジメチルベンゾチアゾリウム (11a、1.01 g) の溶液に過剰のエチルN-フェニルフォルミジエート (1.5 g) を添加し、そして室温で4日間攪拌した。溶媒を減圧下で乾燥するまで蒸発させた。上記固体をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、塩化メチレン/メタノール) 精製にかけた。上記生成物を含む画分を混合し、そして減圧下で乾燥するまで濃縮した。上位固体をメタノール (10 mL) に溶解し、そしてエチルエーテル (200 mL) で沈殿した。50℃のオープン内で高い吸引下で一晩乾燥後、0.88 g (60%) の黄色固体を得た。TLC (シリカゲル、4 : 1 塩化メチレン-メタノール)  $R_f = 0.60$ 。

## 【0079】

臭化3-(2-ヒドロキシ)エチル-2-(2-N-フェニル)エテニルベンゾチアゾリウム (12b) の調製。メタノール/エタノール (3 : 1、80 mL) の混合した溶媒中の臭化3-(2-ヒドロキシ)エチル-2-メチルベンゾチアゾリウム (11b、1.19 g) の溶液に過剰のエチルN-フェニルフォルミジエート (3.0 g) を添加し、そして室温で36時間攪拌した。溶媒を減圧下で乾燥するまで蒸発した。上記固体をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、塩化メチレン/メタノール) 精製にかけた。上記生成物を含む画分を混合し、そして減圧下で乾燥するまで濃縮した。上記固体をメタノール (10 mL) 中に溶解し、そしてエチルエーテル (200 mL) で沈殿させた。50℃のオープン内で高い吸引下で一晩乾燥させた後、1.04 g (63%) の黄色固体を得た。TLC (シリカゲル、4 : 1 塩化メチレン-メタノール)  $R_f = 0.58$ 。

## 【0080】

実施例（1C）中の合成スキームII下の13として示される色素化合物の調製。塩化メチレン（5 mL）中の臭化3-（2-ヒドロキシ）エチル-2-（2-N-フェニル）エテニルベンゾチアゾリウム（12b、41.9 mg）及び臭化1-ベンジルレピジニウム（6、33.4 mg）の溶液にトリエチルアミン（44.3  $\mu$ L）及び酢酸無水物（30.1  $\mu$ L）を添加した。室温で1時間攪拌後、上記溶媒を減圧下で蒸発させ、青色固体を得た。上記固体をメタノール（10 mL）中に再溶解し、そして酢酸エチル（200 mL）を添加した。生ずる固体をろ過を介して回収し、酢酸エチル（3 $\times$ 10 mL）で洗浄し、そして乾燥させた。上記固体を50℃のオープン内で高い吸引下で一晩さらに乾燥させ、49.1 mg（89%）の青色固体を得た。TLC（シリカゲル、9：1 塩化メチレン-メタノール） $R_f$  = 0.43。吸収スペクトル：636 nm（メタノール）。

#### 【0081】

実施例（1C）中の合成スキームII下の14として示される色素化合物の調製。塩化メチレン（15 mL）及びメタノール（1 mL）中の臭化3-（2-ヒドロキシ）エチル-2-（2-N-フェニル）エテニルベンゾチアゾリウム（12b、120.5 mg）及び臭化1-（3'-5'-ジメトキシベンジル）レピジニウム（7、119.5 mg）の溶液にトリエチルアミン（133  $\mu$ L）及び酢酸無水物（90  $\mu$ L）を添加した。室温で30分間攪拌後、上記溶媒を減圧下で蒸発させ、青色固体を得た。上記固体をメタノール（10 mL）中に再溶解し、そしてアセトン（100 mL）及び酢酸エチル（100 mL）を添加した。生ずる固体をろ過を介して回収し、酢酸エチル（3 $\times$ 20 mL）で洗浄し、そして乾燥させた。上記固体を50℃のオープン内で高い吸引下で一晩さらに乾燥させ、147.3 mg（80%）の青色固体を得た。TLC（シリカゲル、4：1 塩化メチレン-メタノール） $R_f$  = 0.91。吸収スペクトル：637 nm（メタノール）。

#### 【0082】

実施例（1C）中の合成スキームII下の15として示される色素化合物の調製。塩化メチレン（15 mL）及びメタノール（1 mL）中の臭化3-（2-ヒ

ドロキシ) エチル-2-(2-N-フェニル) エテニルベンゾチアゾリウム (12b、171.1mg) 及び臭化1-(4'-カルボキシメチル-ベンジル) レピジニウム (8、168.8mg) の溶液にトリエチルアミン (189  $\mu$ L) 及び酢酸無水物 (128  $\mu$ L) を添加した。室温で1時間攪拌後、上記溶媒を減圧下で蒸発させ、青色固体を得た。上記固体をメタノール (10mL) 中に再溶解し、そしてアセトン (50mL) 及び酢酸エチル (50mL) を添加した。生ずる固体をろ過を介して回収し、酢酸エチル (3 $\times$ 30mL) で洗浄し、そして乾燥させた。上記固体を50℃のオープン内で高い吸引下で一晩さらに乾燥させ、208.9mg (80%) の青色固体を得た。TLC (シリカゲル、4:1 塩化メチレン-メタノール)  $R_f$  = 0.80。吸収スペクトル: 639nm (メタノール)。

#### 【0083】

実施例 (1C) 中の合成スキーム I I 下の16として示される色素化合物の調製。塩化メチレン (5mL) 及びメタノール (1mL) 中のヨー化3-メチル-2-(2-N-フェニル) エテニルベンゾチアゾリウム (12a、144.6mg) 及び臭化1-(2'-ボロン酸) ベンジルレピジニウム (9、131.3mg) の溶液にトリエチルアミン (153  $\mu$ L) 及び酢酸無水物 (104  $\mu$ L) を添加した。室温で15分間攪拌後、上記溶媒を減圧下で蒸発させ、青色固体を得た。上記固体をメタノール (5mL) 中に再溶解し、そして酢酸エチル (200mL) を添加した。生ずる固体をろ過を介して回収し、酢酸エチル (3 $\times$ 30mL) で洗浄し、そして乾燥させた。上記固体を50℃のオープン内で高い吸引下で一晩さらに乾燥させ、107mg (50%) の青色固体を得た。TLC (シリカゲル、4:1 塩化メチレン-メタノール)  $R_f$  = 0.58。吸収スペクトル: 634nm (メタノール)。

#### 【0084】

##### D. 色素貯蔵溶液

ジメチルスルフォキシド (DMSO) 中の5mMの濃度の色素の貯蔵溶液を絶対量のそれぞれの色素化合物を好適な体積のDMSO中に溶解することにより調製した。

## 【0085】

E. 色素スペクトロスコピー

スペクトロスコピー計測のために、PBS中のそれぞれの色素の個々のサンプル溶液をその貯蔵溶液の一部をリン酸緩衝塩水（PBS）に希釈することにより調製した。特別には、1の実験において、上記色素溶液を、2  $\mu$  lの5 mM貯蔵色素溶液を5 mLのPBSと混合して最終2  $\mu$  Mの色素濃度を与えることにより調製した。上記溶液の蛍光スペクトルを633 nmの励起波長を用いてスペクトロフルオロメーターで計測した。

## 【0086】

RNAに結合した本発明に係る上記色素溶液を、2  $\mu$  Lの5 mM色素貯蔵溶液及び1 mg/mLのRNA濃度でPBS中に溶解した5 mLのRNA溶液を混合することにより調製した。それぞれの色素/RNA溶液の蛍光スペクトルを633 nmの励起波長を用いてスペクトロフルオロメーターで計測した。

## 【0087】

DNAに結合した本発明に係る色素溶液を、2  $\mu$  lの5 mM色素貯蔵溶液及び0.5 mg/mLのDNA濃度でPBS中に溶解した5 mLのDNA溶液を混合することにより調製した。それぞれの色素/DNA溶液の蛍光スペクトルを633 nmの励起波長を用いてスペクトロフルオロメーターで計測した。

## 【0088】

F. 赤色励起可能な色素の流動細胞光度測定法

XL（商標）流動細胞高度測定器 [Beckman Coulter Inc., Miami, Florida] は、本明細書中に示される本発明に係る赤色-励起可能な色素を用いる実験を行うのに使用された。上記流動細胞高度測定器はHeNeレーザー（632.8 nm）及び2の赤色-感受性フォトマルチプライヤー管（PMT）を導入することにより、標準のXL（商標）流動細胞高度測定器から改変された。上記レーザーからの約11.5 mWの632.8 nmのレーザー光は上記流動細胞高度測定器のビーム形の光学で入射された。直交の方向における前方光散乱（FS）、側方散乱（SS）及び1の蛍光（FL）パラメーターが上記赤血球を分析するために計測された。上記赤血球はSS対FSドッ

トプロット上にゲートされた。固定されたゲートはその後FL対FSドットプロット上のreticsを計測するのに使用された。

【0089】

#### G. 引用分析

網状赤血球用の別々の分析は(1) 488nmアルゴンレーザーを照明源として有する、標準のXL(商標)流動細胞高度測定器[Beckman Coulter Inc., Miami, Florida]を用いる、青色-励起可能な異染性蛍光色素化合物に基づく、標準のBeckman Coulter網状赤血球試薬reticONE(商標)又は(2)FACSCAN(商標)流動細胞光度測定器において488nmで励起されたチアゾールオレンジを用いる、慣用のRetic-Count(商標)網状赤血球計測法(Becton Dickinson Cat. #349204)のいずれかを用いて行われた。上記reticONE(商標)法において、FS、SS、及び2のFLパラメーターは、上記reticONE(商標)試薬中に含まれる上記青色-励起可能な蛍光色素で染色された上記赤血球を分析するために計測された。計測された2のFLパラメーターのうち、1はDNAに結合した色素のための蛍光に一致する、525nmで計測され、そしてもう一方はRNAに結合した色素に一致する、675nmで計測される。商業的なXL(商標)流動細胞光度測定器で入手可能な自動化された開閉アルゴリズムはDNA対RNA蛍光ドットプロットからの網状赤血球のパーセントを計測した。この方法は米国特許第5639,666号中に示される。

【0090】

上記Retic-Count(商標)法には、FS、SS、及び1のFLパラメーターがRetic-Count(商標)試薬中に含まれる上記青色-励起可能な蛍光色素チアゾールオレンジで染色された赤血球を分析するために計測された。

【0091】

#### 実施例(2) - 結合及び非結合状態における本発明に係る色素の蛍光比較

蛍光色素を網状赤血球計測の好適な候補として同定するために、さまざまな異

なる化合物の上記蛍光特性が決定された。網状赤血球の計測には、それらがRNAに結合していないときは弱い蛍光であるが、それらがRNAに結合しているときは蛍光強度における顕著な高まりを示す色素を有することが最も所望される。しかしながら、どの色素化合物がRNAの非存在下及び存在下の両方においてその蛍光活性にこの理想的な組み合わせ効果を有するであろうか予想することは可能ではない。意義深いことに、本発明は本発明に係る色素はRNAの敏感な検出に必要とされる好ましい蛍光特性を有することを見出した。

蛍光計測には、DMSO中のそれぞれの化合物の貯蔵溶液を作成した（実施例（1D）中に示される）。この貯蔵溶液の一部を $2\mu\text{M}$ の色素濃度得るためにPBS中に希釈した。1mlのこの希釈溶液をガラスキューベット中に入れ、そして上記色素をその最大励起波長で励起して蛍光スペクトルを得た。次に、 $8\text{mg/ml}$ の濃度でPBS中に溶解された1mlの遊離のウシ肝臓RNA（Sigma）の溶液、及び上記色素貯蔵溶液の計測された体積がRNA溶液中に $2\mu\text{M}$ の色素濃度を得るために混合された。上記RNA溶液中に希釈されたこの色素溶液をガラスキューベット中に入れ、そして前の計測におけるものと同じ励起を用いて蛍光スペクトルを計測した。例として、図（1A）は、溶液中にRNAあり（上側の曲線を参照のこと）及びなし（下側の曲線を参照のこと）のPBS溶液中の上記色素化合物Retic Red 1の蛍光スペクトルの比較を示す。

#### 【0092】

図（1B）においては、溶液中RNA存在下でのさまざまな化合物の蛍光強度の比較が示される。この図（1B）においては、上記色素の蛍光強度は、本明細書中で引用標準として使用される商業的な色素Syt 62（Molecular Probes Inc.）の蛍光強度に比較して示される。本研究に含まれ、そして図（1B）において示されるがまだ上記に示されていない追加の化合物の構造は表（2）において示される。

#### 【0093】

表（1）は、それらがRNAに結合していない（RNAに非結合である）とき及びそれらがRNA存在下にある（RNAに結合している）ときの、本発明に係る色素、Retic Red 1～Retic Red 6（濃度 $2\mu\text{M}$ ）の蛍光強度を

比較する。これらの強度は上記に示されるように計測されたそれぞれの蛍光スペクトルのピーク発光波長で得られた。図（1C）はグラフ形のRNA-結合及び非結合色素の蛍光強度を比較する。

【表1】

表-1

染料	蛍光強度		蛍光強化比 (結合／非結合)
	RNAに非結合	RNAに結合	
ReticRed1	2.49	791.23	317.763
ReticRed2	1.72	643.77	374.285
ReticRed3	1.28	639.68	499.75
ReticRed4	1.72	713.4	414.767
ReticRed5	2.24	656.06	292.884
ReticRed6	2.75	619.2	225.164

【表2】

表 2

GS6262-43		GS6262-82	
GS6262-45		GS6262-88	
GS6262-55		GS6262-07	
GS6262-58		GS6262-76	
GS6262-60		GS6262-74	
GS6262-62		GS6262-16	

【0094】

### 実施例（3）－等張塩水溶液 I S O F L O W（商標）における R e i t c R e d 1 での網状赤血球の染色

地元の病院から得られた血液サンプルは、R e t i c R e d 1（実施例（1A）及び（D）において示されるように調製された）のみの染色速度を決定するために使用された。上記血液サンプルははじめに2の独立した引用自動化法：r e t i c O N E（商標）法[実施例（1G）中に示された]及びG e n \* S（商標



) instruments (Beckman Coulter) における使用のために入手可能である商業的な方法である、New Methylene Blue法により分析された。上記reticONE (商標) 引用法は7%のreticパーセントを与え、そして上記Gen\* S (商標) 法は6.7%のreticパーセントを与えた。

#### 【0095】

ReticRed1を用いた計測には、 $1\mu\text{l}$ の全血を、 $5\mu\text{M}$ のReticRed1 (実施例(1C)中に示される5mMの貯蔵溶液から希釈された) 溶液を含む、1mlの等張塩水溶液に添加し、そして10及び40分間インキュベートした。上記サンプルをその後、実施例(1E)で示されるように赤色HeNeレーザー(632.8nm)を導入するように改変されたXL (商標) 流動細胞光度測定器内で分析した。全血をReticRed1で処理し、そして赤血球の集団に由来する660nm帯における流動、赤色蛍光内で分析し、そして上記細胞におけるReticRed1に結合された核酸の存在を示した。この蛍光はReticRed1で染色された網状赤血球のためである。上記流動細胞光度測定法のデータは以下のインキュベーション時間に従って要約されうる：(a) 10分間：総計42660、赤血球32841、網状赤血球801、計測されたreticパーセント2.4% (b) 40分間：総計46199、赤血球39713、網状赤血球2310、計測されたreticパーセント5.8%。図(2A)及び(2B)を参照のこと。

#### 【0096】

これらの結果はReticRed1色素のみは細胞内RNAを有効に染色するのに比較的長い時間を必要とすることを明らかに示す。

#### 【0097】

実施例(4) - 全血サンプルを用いたReticRed1での網状赤血球の速い染色

上記の実施例(3)は、等張塩水溶液中の上記色素ReticRed1が網状赤血球を染色するのに比較的長い時間を要することを示したが、私たちはこの色素を本発明に係る追加の試薬組成物の存在下で網状赤血球を染色するのに用いる

ことは染色のためのインキュベーション時間を顕著に減少させることを発見した。4の別々の血液サンプルを用いる実施は上記色素 R e t i c R e d 1 による網状赤血球の速い染色を示すのに示される。

【0098】

A. 実施(1)

1  $\mu$  l の(上記実施例(3)中で示される分析を行うのに使用された血液と同じ提供者からの)全血を、赤血球を球状化する球状化試薬、0.01%の濃度の洗剤 I g e p a l (S i g m a C A - 6 3 0)、5  $\mu$  M の濃度の上記色素 R e t i c R e d 1、及び5  $\mu$  M の最終濃度の p - トルエンスルホン酸一水和物の溶液を含む1 ml の溶液に添加し、そして約1分間インキュベートした。上記サンプルをその後、赤色 H e N e レーザー (632.8 nm) を導入するように改変された X L (商標) 流動細胞光度測定器内で分析した。上記球状化試薬は、約 pH 7.4 及び約 290 mOsm での P B S 中に約 20  $\mu$  g / ml のドデシル- $\beta$ -D-マルトシド及び0.05% P r o c l i n 3 0 0 を含む溶液である。

【0099】

そのようにして R e t i c R e d 1 で染色された上記サンプルをその後 H e N e レーザーからの632.8 nm励起を用いて流動細胞光度測定器内で分析した。660 nm帯における明るい赤色蛍光は網状赤血球に由来する。この実験の結果は図(3)中に示される。このドットプロットにおける上記細胞の分布は、前方分散対蛍光を示し、以前に T a n k e e t . a l . [上記に引用される]により彼らの蛍光に基づいた網状赤血球計測についての業績に関連して示された成熟赤血球及び網状赤血球の分布と一致する。この方法により計測された網状赤血球パーセントは7.3%であった。

【0100】

B. 実施(2)

他の異常な提供者からの1  $\mu$  l の全血を、赤血球を球状化する(実施例(4A)、上記の実施(1)中に示される)球状化試薬、0.01%の濃度の洗剤 I g e p a l (S i g m a C A - 6 3 0)、5  $\mu$  M の濃度の上記色素 R e t i c R e d 1、及び5  $\mu$  M の最終濃度の p - トルエンスルホン酸一水和物の溶液を含

む1 mlの溶液に添加し、そして約1分間インキュベートした。上記サンプルをその後、赤色HeNeレーザー（632.8 nm）を導入するように改変されたXL（商標）流動細胞光度測定器内で分析した。

#### 【0101】

そのようにして上記色素Retic Red 1で染色された上記サンプルを、その後HeNeレーザーからの632.8 nm励起を用いて流動細胞光度測定器内で分析した。この実験の結果は図（4）中に示される。この前方分散対蛍光のドットプロットにおける上記細胞の分布は、上記赤血球を高い蛍光強度で顕著に示す。この実験により計測された網状赤血球パーセントは7.5%であった。このサンプルにおける網状赤血球パーセントの独立の引用値は8%であった。

#### 【0102】

##### C. 実施（3）

正常な提供者からの1  $\mu$  lの全血を、赤血球を球状化する（実施例（4A）、上記の実施（1）中に示される）球状化試薬、0.01%の濃度の洗剤Igepal（Sigma CA-630）、5  $\mu$  Mの濃度の上記色素Retic Red 1、及び5  $\mu$  Mの最終濃度のp-トルエンスルホン酸一水和物の溶液を含む1 mlの溶液に添加し、そして約1分間インキュベートした。上記サンプルをその後、赤色HeNeレーザー（632.8 nm）を導入するように改変されたXL（商標）流動細胞光度測定器内で分析した。そのようにして上記色素Retic Red 1で染色された上記血液サンプルをHeNeレーザーからの632.8 nm励起を用いて流動で分析した。この実験の結果は図（5）中に示される。この実験により計測された網状赤血球パーセントは0.82%であった。商業的に入手可能な臨床血液学分析器におけるニューメチレンブルーを用いた上記同じ提供者からの血液の独立の引用計測は0.95%のreticパーセントを与えた。

#### 【0103】

##### D. 実施（4）

提供者からの1  $\mu$  lの異常な全血を、赤血球を球状化する（実施例（4A）、上記の実施（1）中に示される）球状化試薬、0.01%の濃度の洗剤Igepal（Sigma CA-630）、5  $\mu$  Mの濃度の上記色素Retic Red

1、及び5  $\mu$ Mの最終濃度のp-トルエンスルホン酸ナトリウムの溶液を含む1 mlの溶液に添加し、そして約1分間インキュベートした。上記サンプルをその後、赤色HeNeレーザー（632.8 nm）を導入するように改変されたXL（商標）流動細胞光度測定器内で分析した。

そのようにしてRetic Red 1で染色された上記サンプルを、その後HeNeレーザーからの632.8 nm励起を用いて流動細胞光度測定器内で分析した。この実験の結果は図（6）中に示される。この実験により計測された網状赤血球のパーセントは13.7%であった。この同じサンプルの独立の引用法は13%のreticパーセントを与えた。

#### 【0104】

実施例（5）－全血サンプルを用いたRetic Red 3での網状赤血球の速い染色

##### A. 実施（1）

高い網状赤血球数を有する異常な提供者からの2  $\mu$ lの全血を、赤血球を球状化する（実施例（4A）、上記の実施（1）中に示される）球状化試薬、0.01%の濃度の洗剤Igepal（商標）（Sigma CA-630）、5  $\mu$ Mの濃度の上記色素Retic Red 1、及び50  $\mu$ Mの最終濃度のp-トルエンスルホン酸ナトリウムの溶液を含む1 mlの溶液に添加し、そして約1秒間緩やかに混合し／インキュベートした。上記混合物をその後、分析のために赤色HeNeレーザーを含む上記XL（商標）流動細胞光度測定器内に吸引した。

#### 【0105】

この実験の結果は図（7）中に示され、ここで、上記網状赤血球はそれらに関連した高い蛍光強度により成熟した赤血球と区別される。この実験により計測された網状赤血球パーセントは13.8%であった。（488 nmで励起されるチアゾールアレンジを用いる）上記慣用のRetic-Count（商標）網状赤血球計測法を用いた、このサンプルについてFACSCAN流動細胞光度測定器内で計測された網状赤血球パーセントの独立の引用値は13.3%であった。

#### 【0106】

##### B. 実施（2）

低い網状赤血球数を有する異常な提供者からの $2\mu\text{l}$ の全血を、赤血球を球状化する（実施例（4A）、上記の実施（1）中に示される）球状化試薬、0.01%の濃度の洗剤Igepal（Sigma CA-630）、 $5\mu\text{M}$ の濃度の上記色素Retic Red 1、及び $50\mu\text{M}$ の最終濃度のp-トルエンスルホン酸ナトリウムの溶液を含む $1\text{ml}$ の溶液に添加し、そして約1秒間緩やかに混合し／インキュベートした。上記混合物をその後、分析のために上記赤色HeNeレーザーを含む上記XL（商標）流動細胞光度測定器内に吸引した。

この実験の結果は図（8）中に示される。この実験により計測された網状赤血球パーセントは1%であった。上記慣用のRetic-Count（商標）網状赤血球計測法（ $488\text{nm}$ で励起されるチアゾールアレンジ）を用いた、このサンプルについてFACSCAN流動細胞光度測定器内で計測された網状赤血球パーセントの独立の引用値は1.3%であった。

【0107】

#### 実施例（6）－結合の及び非結合の状態における本発明に係る色素の蛍光強度の比較

結合の及び非結合の状態における上記色素の比較の蛍光強度を比較するため、蛍光計測は、好適な条件下で $633\text{nm}$ でそれぞれの色素溶液を励起し、それぞれのサンプルの蛍光スペクトルを記録し、そしてこれらの蛍光スペクトルのピークでの強度を計測することによりスペクトロフルオロメーター内で行われた。

DNA又はRNAの非存在下（すなわち、非結合の状態）で上記色素溶液の蛍光強度を計測するために、はじめにDMSO中のそれぞれの化合物の貯蔵溶液を調製した（実施例（1D）中に示されるように）。上記色素-1の貯蔵溶液の一部をPBS中に希釈し、 $2\mu\text{l}$ の色素濃度を得た。次に、 $1\text{ml}$ のこの希釈溶液をガラスキューベット中に入れ、そしてこの溶液の蛍光スペクトルを $633\text{nm}$ の励起波長を用いてスペクトロフルオロメーターにより計測した。

次に、 $1\text{mg}/\text{ml}$ の濃度でPBS中に溶解した遊離のTorula酵母RNA（Sigma）の $1\text{ml}$ の溶液、及び上記色素-1の上記色素貯蔵溶液の計測された体積を混合し、上記RNA溶液中に $2\mu\text{M}$ の色素濃度を得た。RNAの存在下でのこの色素溶液の蛍光スペクトルを $633\text{nm}$ で上記サンプルを照射する

ことにより計測した。図(9A)は上記溶液中に存在するRNAあり(上側の曲線を参照のこと)及びなし(下側の曲線を参照のこと)のPBS溶液中の上記色素色素-1の蛍光スペクトルの比較を示す。

【0108】

DNAにおける蛍光計測のために、0.5mg/mlの濃度でPBS中に溶解された遊離のウシ胸腺DNA(Sigma)の1mlの溶液、及び上記色素貯蔵溶液の計測された体積を混合し、上記RNA溶液中に2 $\mu$ Mの色素濃度を得た。次に、上記色素溶液の蛍光スペクトルを、633nmで上記サンプルを照射することにより計測した。図(9B)は、上記溶液中に存在するDNAあり(上側の曲線を参照のこと)及びなし(下側の曲線を参照のこと)のPBS溶液中での上記色素色素-1の蛍光スペクトルの比較を示す。

同じ様式で、上記に示される実験を、上記色素色素-2～色素-6について繰り返した(図(9C)～及び(9L)を参照のこと)。

【0109】

表(3)は、それらがRNAに結合していない(RNAに非結合の)とき、それらがRNAの存在下にある(RNAに結合している)とき、そしてそれらがDNAの存在下にある(DNAに結合している)ときの、本発明に係る色素、色素-1及び色素-2(濃度2 $\mu$ M)の比較の蛍光強度を比較する。これらの強度は上記に示されるそれぞれの蛍光スペクトルのピークで得られた。

【表3】

表-3

染料 (濃度、2 $\mu$ M)	蛍光強度		
	RNAに非結合	RNAに結合 1 mg/ml	DNAに結合 0.5mg/ml
Dye-1	10	825	578
Dye-2	18	560	760

## 【0110】

表(4)は、それらがRNAに結合していない(RNAに非結合の)とき及びそれらがRNAの存在下にある(RNAに結合している)ときの、本発明に係る上記群-I II I色素(色素-3～色素-6)の蛍光強度を比較する。上記強度は発光スペクトルのピークで計測された。

表(5)は、それらがDNAに結合していない(DNAに非結合の)とき及びそれらがDNAの存在下にある(DNAに結合している)ときの、本発明に係る上記群-I II I色素(色素-3～色素-6)の蛍光強度を比較する。上記強度は発光スペクトルのピークで計測された。

## 【表4】

表-4

染料 (濃度、2 $\mu$ M)	蛍光強度	
	RNAに非結合	RNAに結合 1 mg/ml
Dye-3	10	328
Dye-4	12	370
Dye-5	10	420
Dye-6	6	410

表-5

染料	蛍光強度	
	DNAに非結合	DNAに結合 0.5mg/ml
Dye-3	15	400
Dye-4	12	440
Dye-5	10	660
Dye-6	4	380

【0111】

実施例（7）－全血サンプルを用いた色素－1での網状赤血球の速い染色

私たちは上記色素色素－1が本発明に係る試薬組成物の存在下で網状赤血球の細胞膜を速く通り抜けることができ、したがって染色のためのインキュベーション時間を顕著に減少させることを発見した。3の別々の血液サンプルを用いた実験は上記色素色素－1による網状赤血球の速い染色を示すために示される。私た



ちはこれらの3の実験をそれぞれ実施(1)、実施(2)及び実施(3)という。

#### 【0112】

##### A. 実施(1)

正常な提供者からの1 $\mu$ lの全血を、上記赤血球を球状化する球状化試薬、0.01%の濃度の洗剤Igepal(Sigma CA-630)、5 $\mu$ Mの濃度の上記色素色素-1を含む1mlの溶液に添加し、そして、その後即座に、分析のために赤色HeNeレーザー(632.8nm)を導入するように改変されたXL(商標)流動細胞光度測定器内に吸引した。上記球状化試薬は約pH7.4及び約290mOsmでPBS中に約20 $\mu$ g/mlのドデシル- $\beta$ -D-マルトシド及び0.05%Procclin300を含む溶液である。

図(10A)はこのサンプルについての成熟赤血球に比較した網状赤血球からの蛍光を示す。この方法により計測された網状赤血球パーセントは1.9%であり、予想された正常な範囲内であった。

#### 【0113】

##### B. 実施(2)

異常な提供者からの1 $\mu$ lの全血を、上記赤血球を球状化する(実施例(7)、上記の実施(1)中に示される)球状化試薬、0.01%の濃度の洗剤Igepal(Sigma CA-630)、及び5 $\mu$ Mの濃度の上記色素色素-1を含む1mlの溶液に添加した。その後即座に、上記混合物を、分析のために赤色HeNeレーザー(632.8nm)を導入するように改変されたXL(商標)流動細胞光度測定器内に吸引した。

#### 【0114】

図(10B)はこのサンプルについての成熟赤血球に比較した網状赤血球からの蛍光を示す。この前方分散対蛍光のドットプロットにおける上記細胞の分布は比較的高い蛍光強度で上記網状赤血球を顕著に示す。この方法により計測された網状赤血球パーセントは10.6%であった。このサンプルにおける網状赤血球パーセントの独立の引用値は12%であった。

#### 【0115】

### C. 実施(3)

他の異常な提供者からの1  $\mu$  lの全血を、上記赤血球を球状化する(実施例(7)、上記実施(1)中に示される)球状化試薬、0.01%の濃度の洗剤Igepal (Sigma CA-630)、及び5  $\mu$  Mの濃度の上記色素色素-1を含む1 mlの溶液に添加した。その後即座に、上記混合物を、分析のために赤色HeNeレーザー(632.8 nm)を導入するように改変されたXL(商標)流動細胞光度測定器内に吸引した。

#### 【0116】

図(10C)はこのサンプルについての成熟赤血球に比較した網状赤血球からの蛍光を示す。この前方分散対蛍光のドットプロットにおける上記細胞の分布は高い蛍光強度で上記網状赤血球を顕著に示す。この方法により計測された網状赤血球パーセントは26.3%であった。このサンプルにおける網状赤血球パーセントの独立の引用値は27%であった。

#### 【0117】

### 実施例(8) - 全血サンプルを用いた色素-2での網状赤血球の速い染色

私たちは、色素-2も本発明に係る試薬組成物の存在下で網状赤血球の細胞膜を速く通り抜けることができ、それゆえ、上記染色のためのインキュベーション時間を顕著に減少させることを発見した。3の異なる血液サンプルを用いた実験は上記色素色素-2による網状赤血球の速い染色を示すために示される。私たちはこれらの3の実験をそれぞれ、実施(4)、実施(5)及び実施(6)という。

#### 【0118】

### A. 実施(4)

正常な提供者からの1  $\mu$  lの全血を、上記赤血球を球状化する球状化試薬、0.01%の濃度の洗剤Igepal (Sigma CA-630)、5  $\mu$  Mの濃度の上記色素色素-2を含む1 mlの溶液に添加し、そして、その後即座に、分析のために赤色HeNeレーザー(632.8 nm)を導入するように改変されたXL(商標)流動細胞光度測定器内に吸引した。上記球状化試薬は約pH 7.4及び約290 mOsmでPBS中に約20  $\mu$  g/mlのドデシル- $\beta$ -D-マ

ルトシド及び0.05%Proc lin300を含む溶液である。

図(11A)はこのサンプルについての成熟赤血球に比較した網状赤血球からの蛍光を示す。この方法により計測された網状赤血球パーセントは1.8%であった。

#### 【0119】

##### B. 実施(5)

異常な提供者からの1 $\mu$ lの全血を、上記赤血球を球状化する(実施例(7)、上記実施(1)中に示される)球状化試薬、0.01%の濃度の洗剤Igepal(Sigma CA-630)、及び5 $\mu$ Mの濃度の上記色素色素-2を含む1mlの溶液に添加した。その後即座に、上記混合物を、分析のために赤色HeNeレーザー(632.8nm)を導入するように改変されたXL(商標)流動細胞光度測定器内に吸引した。

図(11B)はこのサンプルについての成熟赤血球に比較した網状赤血球からの蛍光を示す。この前方分散対蛍光のドットプロットにおける上記細胞の分布は高い蛍光強度で上記網状赤血球を明らかに示す。この実験により計測された網状赤血球パーセントは12.5%であった。このサンプルにおける網状赤血球の独立の引用値は12%であった。

#### 【0120】

##### C. 実施(6)

高いreticの異常な提供者からの1 $\mu$ lの全血を、上記赤血球を球状化する(実施例(7)、上記実施(1)中に示される)球状化試薬、0.01%の濃度の洗剤Igepal(Sigma CA-630)、及び5 $\mu$ Mの濃度の上記色素色素-2を含む1mlの溶液に添加した。その後即座に、上記混合物を、分析のために赤色HeNeレーザー(632.8nm)を導入するように改変されたXL(商標)流動細胞光度測定器内に吸引した。

#### 【0121】

図(11C)はこのサンプルについての成熟赤血球に比較した網状赤血球からの蛍光を示す。この前方分散対蛍光のドットプロットにおける上記細胞の分布は高い蛍光強度で上記網状赤血球を顕著に示す。この実験により計測された網状赤

血球パーセントは24%であった。このサンプルにおける網状赤血球パーセントの独立の引用値は27%であった。

【0122】

実施例（9）－全血サンプルを用いた色素－3での網状赤血球の速い染色

A. 実施（7）

正常な提供者からの1 $\mu$ lの全血を、上記赤血球を球状化する球状化試薬、0.01%の濃度の洗剤Igepal（Sigma CA-630）、5 $\mu$ Mの濃度の上記色素色素－3を含む1mlの溶液に添加し、そして、その後即座に、分析のために赤色HeNeレーザー（632.8nm）を導入するように改変されたXL（商標）流動細胞光度測定器内に吸引した。上記球状化試薬は約pH7.4及び約290mOsmでPBS中に約20 $\mu$ g/mlのドデシル- $\beta$ -D-マルトシド及び0.05%Proclin（商標）300を含む溶液である。この方法により計測された網状赤血球パーセントは2.3%であった（図（4A）を参照のこと）。

【0123】

B. 実施（8）

異常な提供者からの1 $\mu$ lの全血を、上記赤血球を球状化する（実施例（7）、上記実施（1）中に示される）球状化試薬、0.01%の濃度の洗剤Igepal（Sigma CA-630）、及び5 $\mu$ Mの濃度の上記色素色素－3を含む1mlの溶液に添加した。その後即座に、上記混合物を、分析のために赤色HeNeレーザー（632.8nm）を導入するように改変されたXL（商標）流動細胞光度測定器内に吸引した。この実験により計測された網状赤血球パーセントは14.6%であった（図（4A）を参照のこと）。このサンプルにおける網状赤血球パーセントの独立の引用値は12%であった。

【0124】

C. 実施（9）

他の異常な提供者からの1 $\mu$ lの全血を、上記赤血球を球状化する（実施例（7）、上記実施（1）中に示される）球状化試薬、0.01%の濃度の洗剤Igepal（Sigma CA-630）、及び5 $\mu$ Mの濃度の上記色素色素－3

を含む1mlの溶液に添加した。その後即座に、上記混合物を、分析のために赤色HeNeレーザー（632.8nm）を導入するように改変されたXL（商標）流動細胞光度測定器内に吸引した。この実験により計測された網状赤血球パーセントは約24%であった（図（12A）を参照のこと）。このサンプルにおける網状赤血球パーセントの独立の引用値は27%であった。

#### 【0125】

本明細書中に引用される全ての刊行物は本明細書中に援用する。本発明は特に好ましい態様について示したが、本発明の本質から離れることなしに改変がなされうることが理解されるであろう。上記改変は添付の請求項の範囲内には入ると意図される。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1A】

図（1A）は、本明細書中後にReticRed1と呼ばれる、実施例（1）において示される色素化合物第6の、PBS溶液中での溶液中に存在するRNAあり又はなしの蛍光スペクトルの比較である。

##### 【図1B】

図（1B）は、商業的な核酸色素Syto62（Molecular Probes, Inc）の蛍光強度に対する、本発明に係る色素及び本実験中に調べられたいくつかの他の色素の蛍光強度の、全て溶液中に同じ量のRNA存在下での比較である。

##### 【図1C】

図（1C）は8mg/mlのRNA存在下での本発明に係る色素、ReticRed1～ReticRed6の、溶液中にRNAが存在しないときのそれらのそれぞれの蛍光強度に比較した、蛍光強度を示す。

##### 【図2A】

図（2A）及び（2B）は、速い染色組成物の存在なしに等張塩水溶液中で上記色素ReticRed1で処理され、そして2の異なる期間インキュベートされた、異常な血液サンプルについての網状赤血球からの蛍光を示す。図（2A）はReticRed1のみで処理し、そして約10分間インキュベートした細胞

からの蛍光を示し：総カウント42660、赤血球32841、網状赤血球801、計測された網状パーセント2.4%である。

【図2B】

図(2B)はRetic Red 1のみで処理し、そして約40分間インキュベートした細胞からの蛍光を示し：総カウント46199、赤血球39713、網状赤血球2310、計測された網状パーセント5.8%である。このサンプルにおける網状赤血球についての引用値は約7%であった。

【図3】

図(3)は、図(2A)及び(2B)中で示される実験において使用されたのと同じ提供者からの、上記色素Retic Red 1を含む本発明に係る組成物で処理され、そして約1分間インキュベートされた後の、血液サンプルにおける網状赤血球からの蛍光を示す。この方法により計測された網状赤血球のパーセントは7.3%であった。

【図4】

図4は、上記色素Retic Red 1を含む本発明に係る組成物で処理され、そして約1分間インキュベートされた後の、異常な血液サンプルにおける網状赤血球からの蛍光を示す。この方法により計測された網状赤血球のパーセントは7.5%であった。独立の計測法を用いてこの提供者について得られた網状赤血球パーセントについての引用値は8%であった。この実施例における試薬組成物はIgepal、ドデシル- $\beta$ -D-マルトシド及びp-トルエンスルホン酸一水化物を含んだ。

【図5】

図(5)は、上記色素Retic Red 1を含む本発明に係る組成物で処理され、そして約1分間インキュベートされた後の、正常な提供者からの血液サンプルにおける網状赤血球からの蛍光を示す。この方法により計測された網状赤血球パーセントは0.82%であった。この実施例における試薬組成物はIgepal、ドデシル- $\beta$ -D-マルトシド及びp-トルエンスルホン酸一水化物を含む。独立の計測法を用いてこの提供者について得られた網状赤血球の引用値は0.95%であった。

## 【図6】

図(6)は、上記色素Retic Red 1を含む本発明に係る組成物で処理され、そして約1分間インキュベートされた後の、異常な血液サンプルにおける網状赤血球からの蛍光を示す。この方法により計測された網状赤血球パーセントは13.7%であった。独立の計測法を用いてこの提供者について得られた網状赤血球パーセントの引用値は13%であった。この態様における試薬組成物はIgepal、ドデシル- $\beta$ -D-マルトシド及びp-トルエンスルホン酸ナトリウムを含んだ。

## 【図7】

図(7)は、上記色素Retic Red 3を含む本発明に係る組成物で処理され、そしてさらにインキュベートされることなしに約1秒間混合された後の、異常な血液サンプルにおける網状赤血球からの蛍光を示す。この方法により計測された網状赤血球パーセントは13.8%であった。慣用のRetic-Count (商標) 法によるこのサンプルについて得られた網状赤血球パーセントの独立の引用値は約13.3%であった。この態様における試薬組成物はIgepal (商標)、ドデシル- $\beta$ -D-マルトシド及びp-トルエンスルホン酸ナトリウムを含んだ。

## 【図8】

図(8)は、上記色素Retic Red 3を含む本発明に係る組成物で処理され、そしてさらにインキュベートされることなしに約1秒間混合された後の、異常な血液サンプルにおける網状赤血球からの蛍光を示す。この方法により計測された網状赤血球パーセントは1%であった。慣用のRetic-Count (商標) 法によるこのサンプルについて得られた網状赤血球パーセントの独立の引用値は約1.3%であった。この態様における試薬組成物はIgepal、ドデシル- $\beta$ -D-マルトシド及びp-トルエンスルホン酸ナトリウムを含んだ。

## 【図9A】

図(9A)は、溶液中にRNAの存在あり又はなしのPBS溶液中における、実施例(1B)において示される上記色素色素-1の蛍光スペクトルの比較である。

## 【図9 B】

図(9 B)は、溶液中にDNAの存在あり又はなしのPBS溶液中における、実施例(1 B)において示される上記色素色素-1の蛍光スペクトルの比較である。

## 【図9 C】

図(9 C)は、溶液中にRNAの存在あり又はなしのPBS溶液中における、実施例(1 B)において示される上記色素色素-2の蛍光スペクトルの比較である。

## 【図9 D】

図(9 D)は、溶液中にDNAの存在あり又はなしのPBS溶液中における、実施例(1 B)において示される上記色素色素-2の蛍光スペクトルの比較である。

## 【図9 E】

図(9 E)は、溶液中にRNAの存在あり又はなしのPBS溶液中における、実施例(1 C)において示される色素-3の蛍光スペクトルの比較である。

## 【図9 F】

図(9 F)は、溶液中にDNAの存在あり又はなしのPBS溶液中における、実施例(1 C)において示される色素-3の蛍光スペクトルの比較である。

## 【図9 G】

図(9 G)は、溶液中にRNAの存在あり又はなしのPBS溶液中における、実施例(1 C)において示される色素-4の蛍光スペクトルの比較である。

## 【図9 H】

図(9 H)は、溶液中にDNAの存在あり又はなしのPBS溶液中における、実施例(1 C)において示される色素-4の蛍光スペクトルの比較である。

## 【図9 I】

図(9 I)は、溶液中にRNAの存在あり又はなしのPBS溶液中における、実施例(1 C)において示される色素-5の蛍光スペクトルの比較である。

## 【図9 J】

図(9 J)は、溶液中にDNAの存在あり又はなしのPBS溶液中における、



実施例（1C）において示される色素－5の蛍光スペクトルの比較である。

【図9K】

図（9K）は、溶液中にRNAの存在あり又はなしのPBS溶液中における、実施例（1C）において示される色素－6の蛍光スペクトルの比較である。

【図9L】

図（9L）は、溶液中にDNAの存在あり又はなしのPBS溶液中における、実施例（1C）において示される色素－6の蛍光スペクトルの比較である。

【図10A】

図（10A）は、速い染色組成物の存在下で等張塩水溶液中において上記色素色素－1で処理され、そしてその後即座に分析された、3の異なる血液サンプル（1は正常、2は異常な高いretics）についての網状赤血球からの蛍光を示す。これらの実施例において、速い染色を促進させるために使用される上記試験組成物はIgepal（商標）、及びドデシル－ $\beta$ －D－マルトシドを含んだ。

【図10B】

図（10B）は、速い染色組成物の存在下で等張塩水溶液中において上記色素色素－1で処理され、そしてその後即座に分析された、3の異なる血液サンプル（1は正常、2は異常な高いretics）についての網状赤血球からの蛍光を示す。これらの実施例において、速い染色を促進させるために使用される上記試験組成物はIgepal（商標）、及びドデシル－ $\beta$ －D－マルトシドを含んだ。

【図10C】

図（10C）は、速い染色組成物の存在下で等張塩水溶液中において上記色素色素－1で処理され、そしてその後即座に分析された、3の異なる血液サンプル（1は正常、2は異常な高いretics）についての網状赤血球からの蛍光を示す。これらの実施例において、速い染色を促進させるために使用される上記試験組成物はIgepal（商標）、及びドデシル－ $\beta$ －D－マルトシドを含んだ。

【図11A】

図(11A)は、速い染色組成物の存在下で等張塩水溶液中において上記色素色素-2で処理され、そしてその後即座に分析された、3の異なる血液サンプル(1は正常、2は異常な高いretics)についての網状赤血球からの蛍光を示す。これらの実施例において、速い染色を促進させるために使用される上記試薬組成物はIgepal(商標)、及びドデシル- $\beta$ -D-マルトシドを含んだ。

【図11B】

図(11B)は、速い染色組成物の存在下で等張塩水溶液中において上記色素色素-2で処理され、そしてその後即座に分析された、3の異なる血液サンプル(1は正常、2は異常な高いretics)についての網状赤血球からの蛍光を示す。これらの実施例において、速い染色を促進させるために使用される上記試薬組成物はIgepal(商標)、及びドデシル- $\beta$ -D-マルトシドを含んだ。

【図11C】

図(11C)は、速い染色組成物の存在下で等張塩水溶液中において上記色素色素-2で処理され、そしてその後即座に分析された、3の異なる血液サンプル(1は正常、2は異常な高いretics)についての網状赤血球からの蛍光を示す。これらの実施例において、速い染色を促進させるために使用される上記試薬組成物はIgepal(商標)、及びドデシル- $\beta$ -D-マルトシドを含んだ。

【図12A】

図(12A)は、異なる数の網状赤血球を含む赤血球の蛍光ヒストグラムを示す。これらの3の異なる血液サンプル(1は正常、2は異常な高いretics)について、それぞれのサンプルは速い染色組成物の存在下で等張塩水溶液中において色素-3で処理され、そしてその後即座にBECKMAN COULTER(商標) XL(商標)流動細胞光度測定器で分析された。これらの実施例において、速い染色を促進させるために使用される上記試薬組成物は洗剤Igepal、及び界面活性剤ドデシル- $\beta$ -D-マルトシドを含んだ。

【図12B】

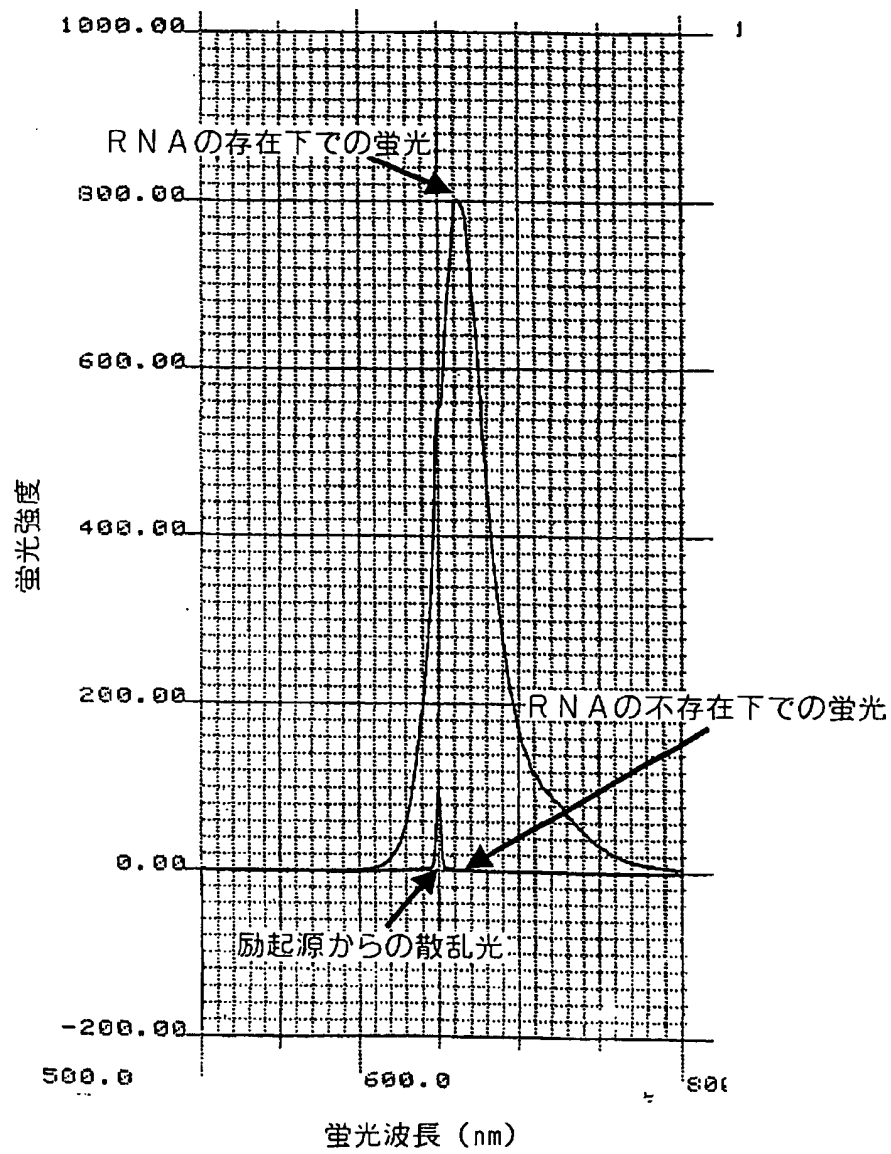
図(12B)は、異なる数の網状赤血球を含む赤血球の蛍光ヒストグラムを示す。これらの3の異なる血液サンプル(1は正常、2は異常な高いretics)について、それぞれのサンプルは速い染色組成物の存在下で等張塩水溶液中において色素-3で処理され、そしてその後即座にBECKMAN COULTER(商標) XL(商標)流動細胞光度測定器で分析された。これらの実施例において、速い染色を促進させるために使用される上記試薬組成物は洗剤Igepal、及び界面活性剤ドデシル- $\beta$ -D-マルトシドを含んだ。

【図12C】

図(12C)は、異なる数の網状赤血球を含む赤血球の蛍光ヒストグラムを示す。これらの3の異なる血液サンプル(1は正常、2は異常な高いretics)について、それぞれのサンプルは速い染色組成物の存在下で等張塩水溶液中において色素-3で処理され、そしてその後即座にBECKMAN COULTER(商標) XL(商標)流動細胞光度測定器で分析された。これらの実施例において、速い染色を促進させるために使用される上記試薬組成物は洗剤Igepal、及び界面活性剤ドデシル- $\beta$ -D-マルトシドを含んだ。

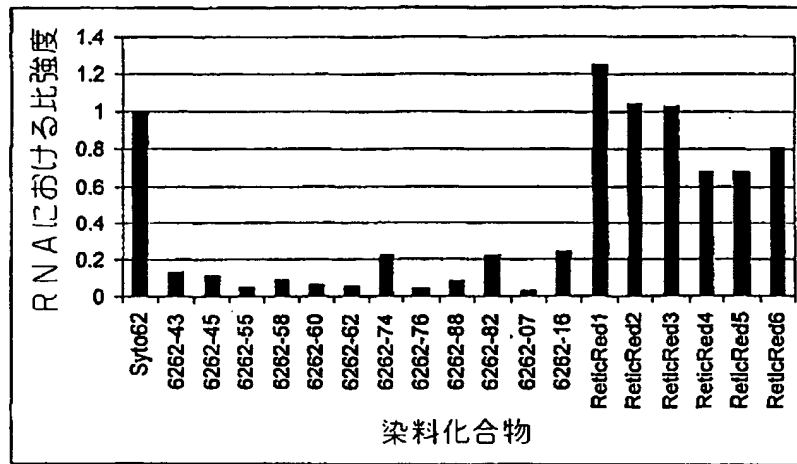
【図1A】

FIG. 1A



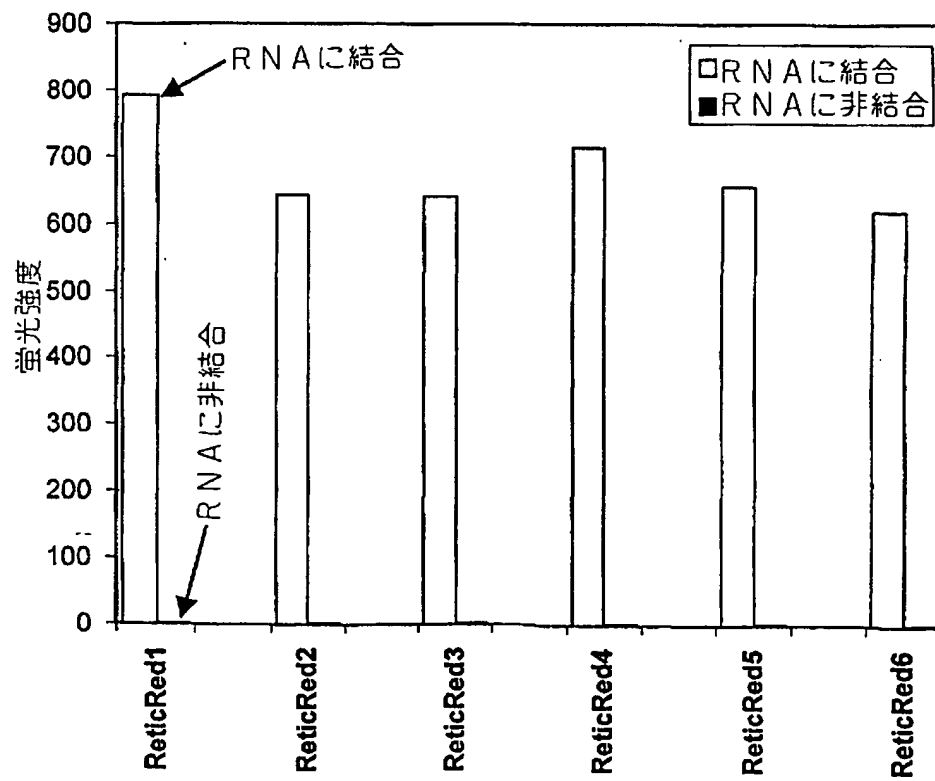
【図1B】

FIG. 1B



【図1C】

FIG. 1C



【図2A】

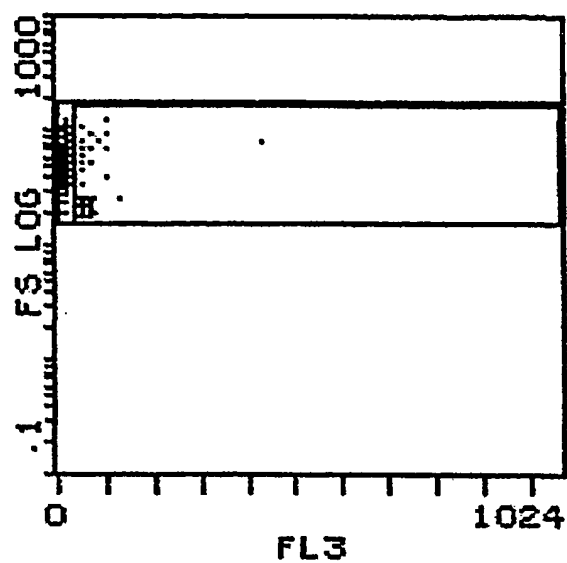


FIG. 2A

【図2B】

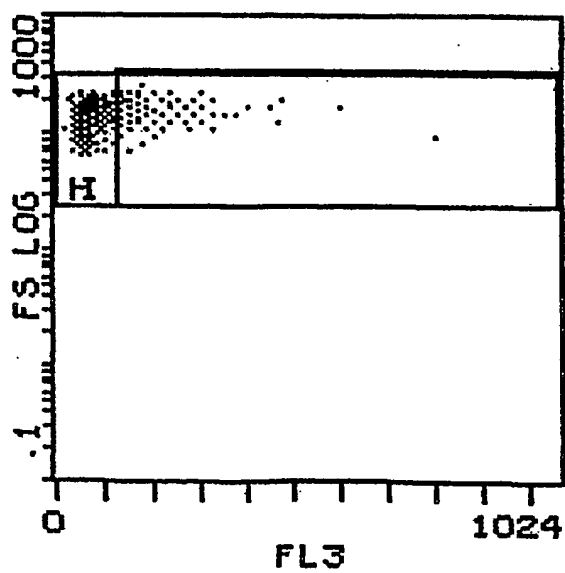


FIG. 2B

【図3】

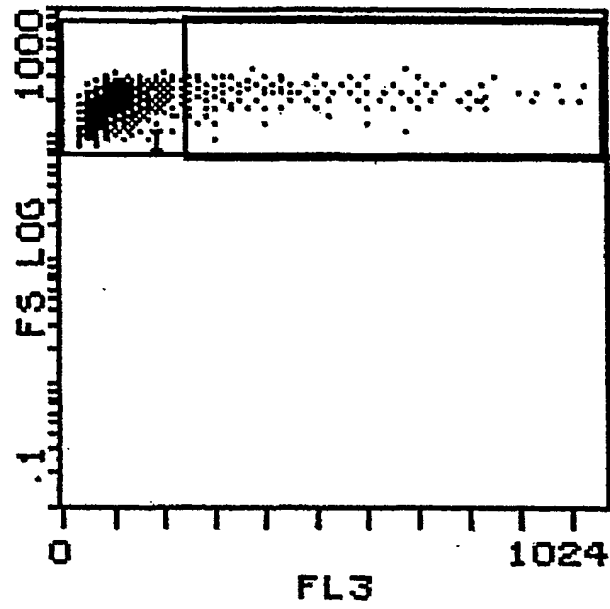


FIG. 3

【図4】

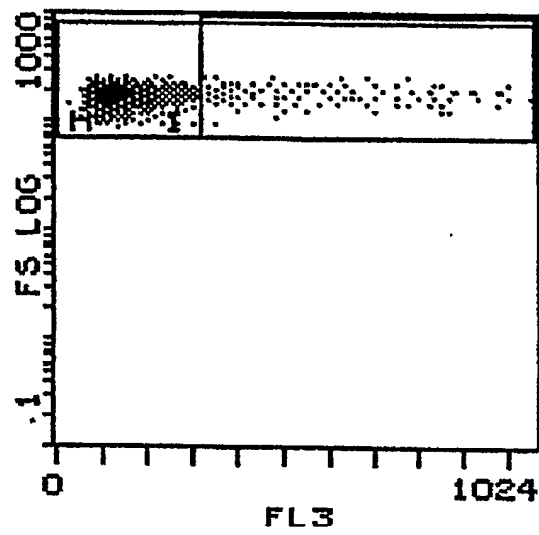
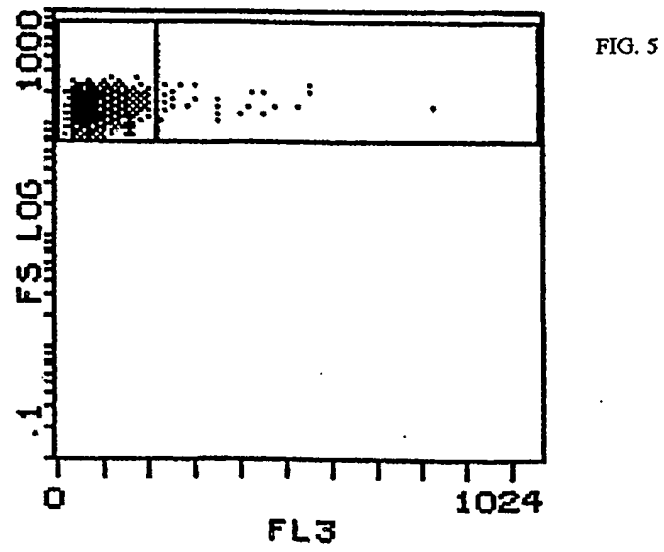


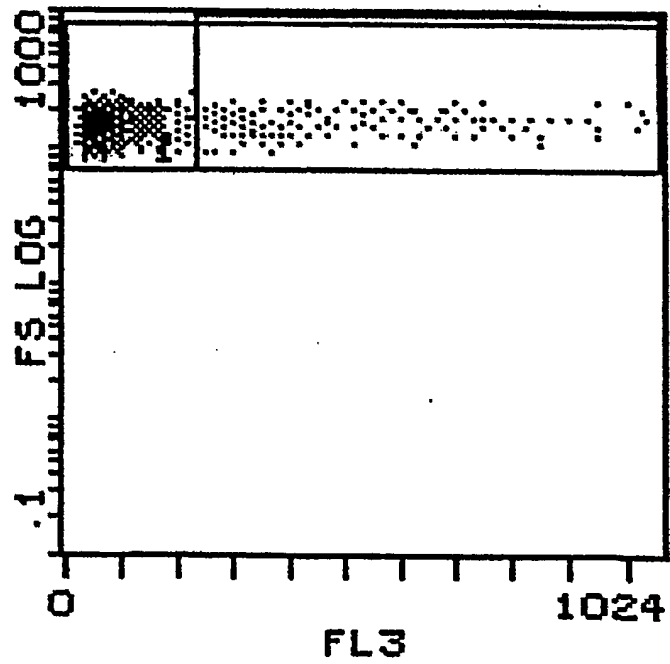
FIG. 4

【図5】



【図6】

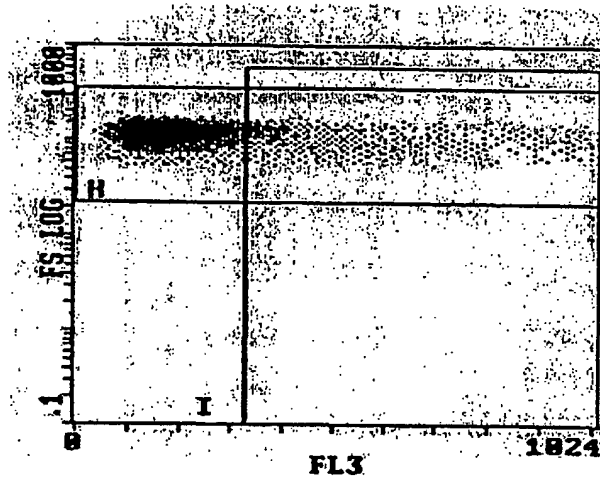
FIG. 6





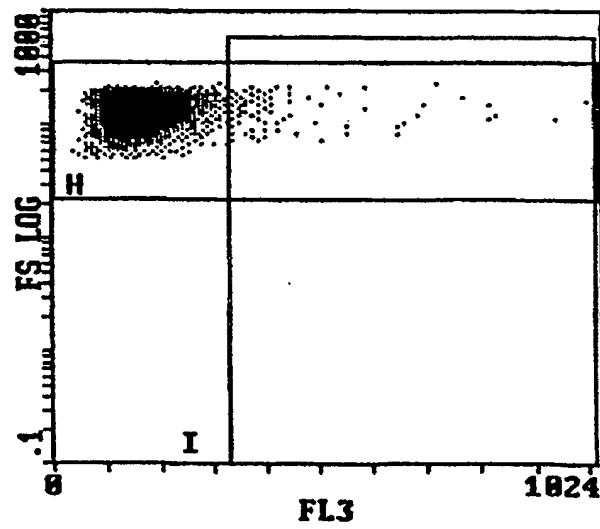
【図7】

FIG. 7



【図8】

FIG. 8



【図9A】

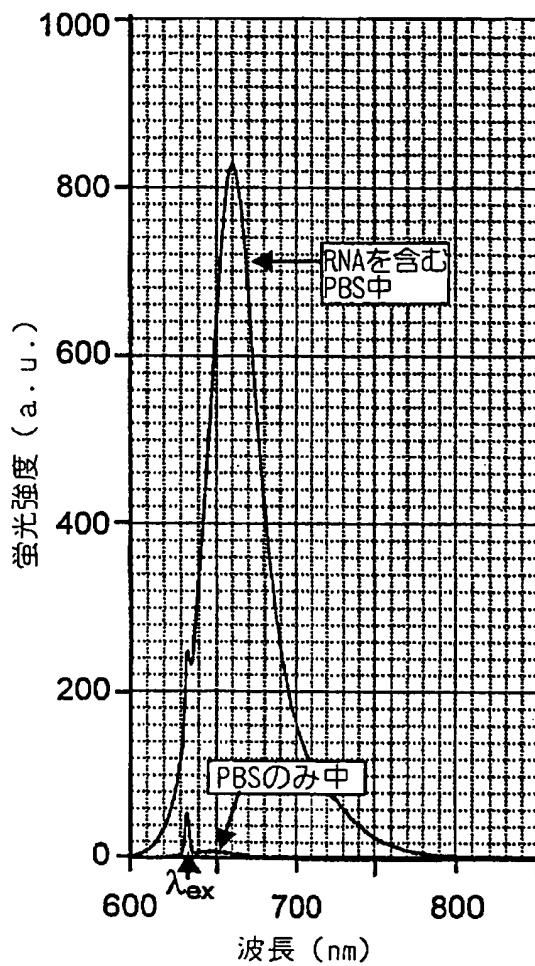


FIG. 9A

【図9B】

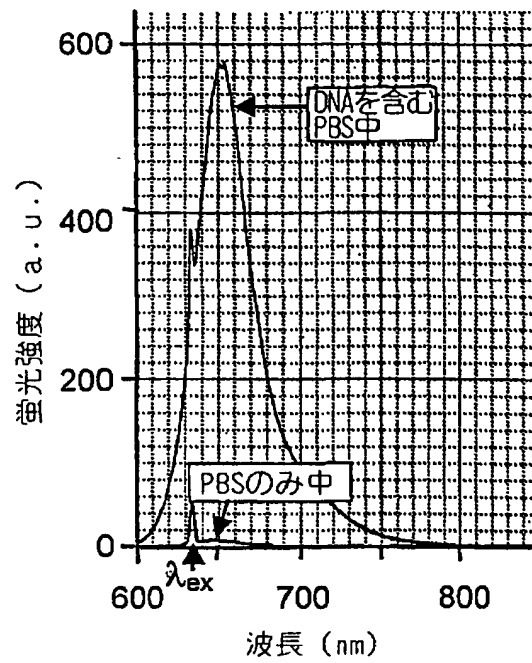


FIG. 9B

【図9C】

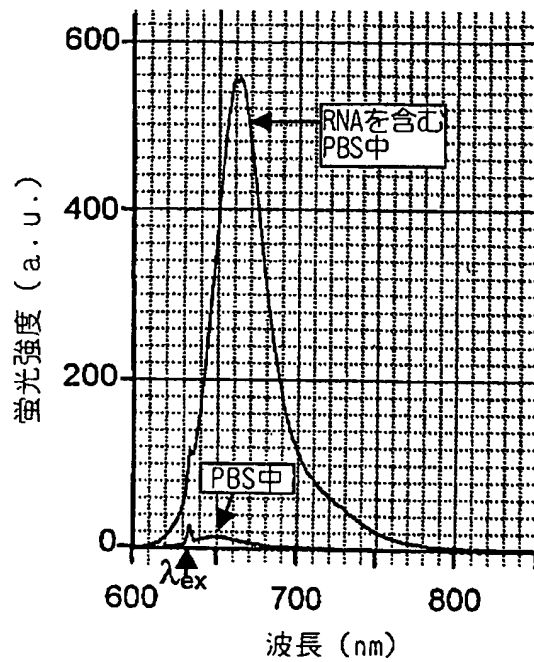


FIG. 9C

【図9D】

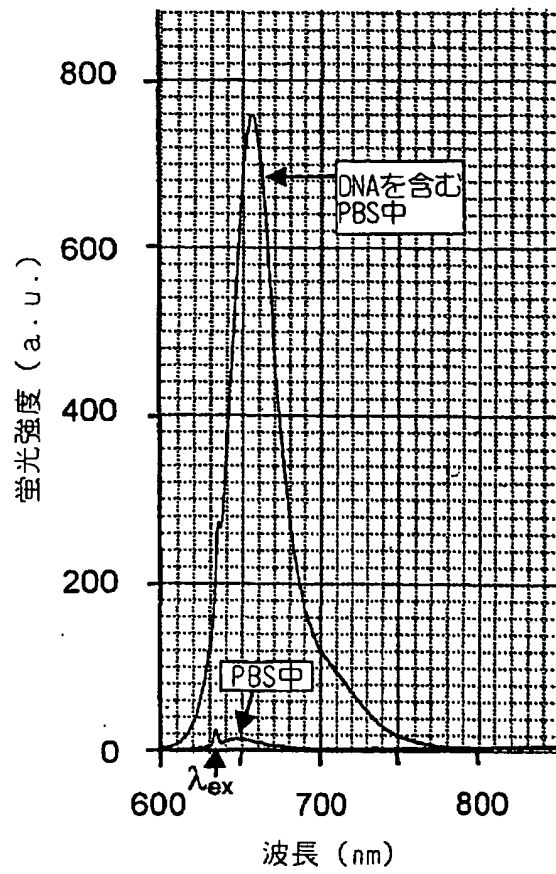


FIG. 9D

【図9E】

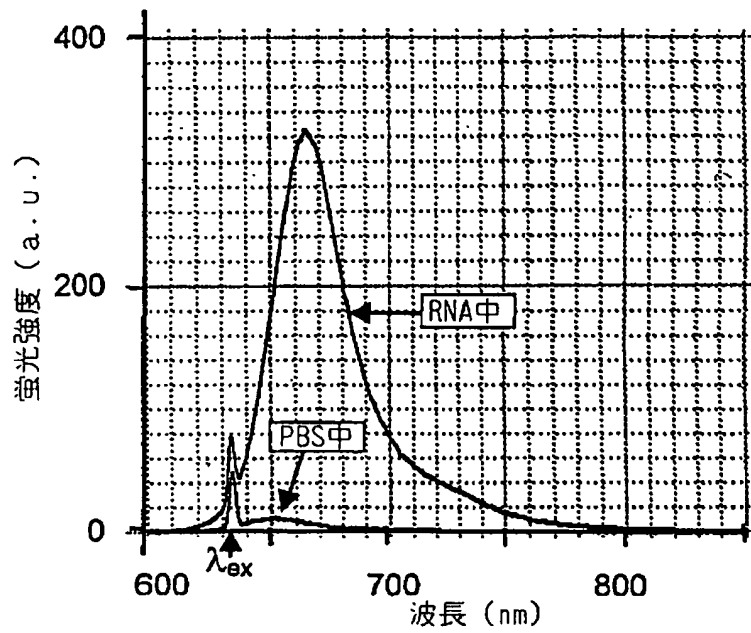


FIG. 9E

【図9F】

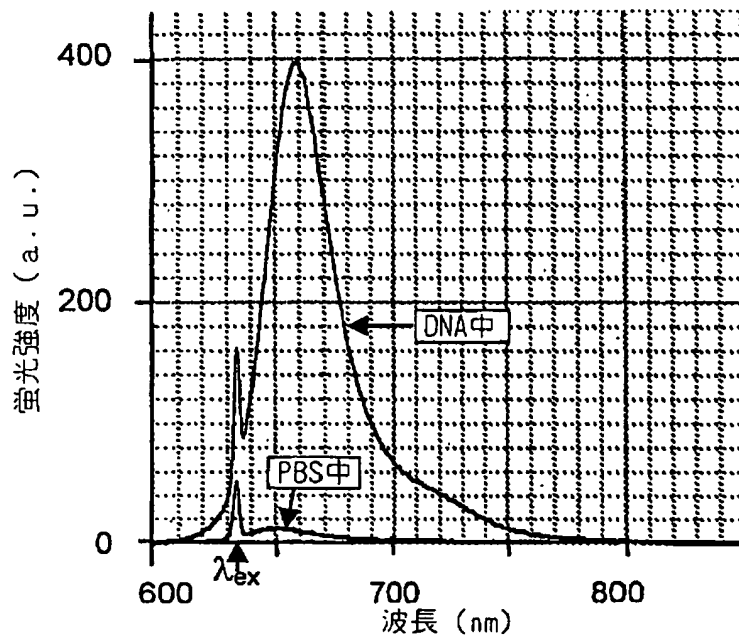


FIG. 9F

【図9G】

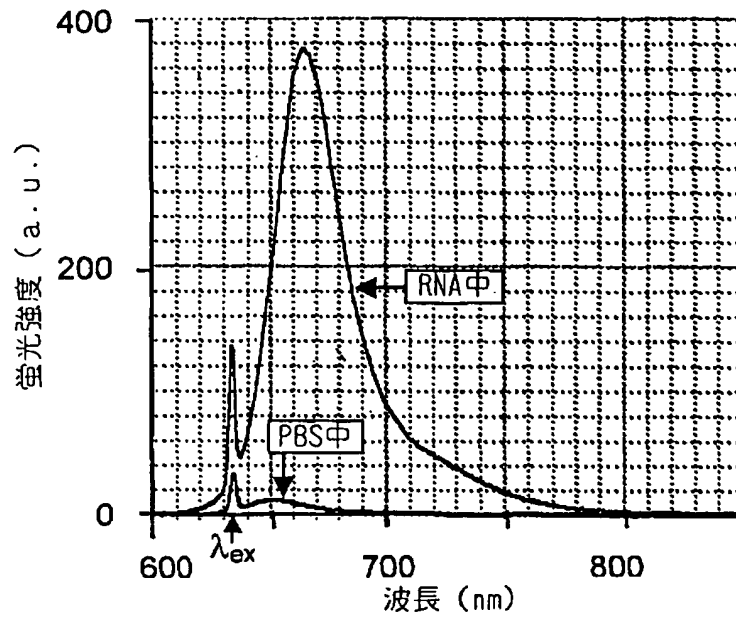


FIG. 9G

【図9H】

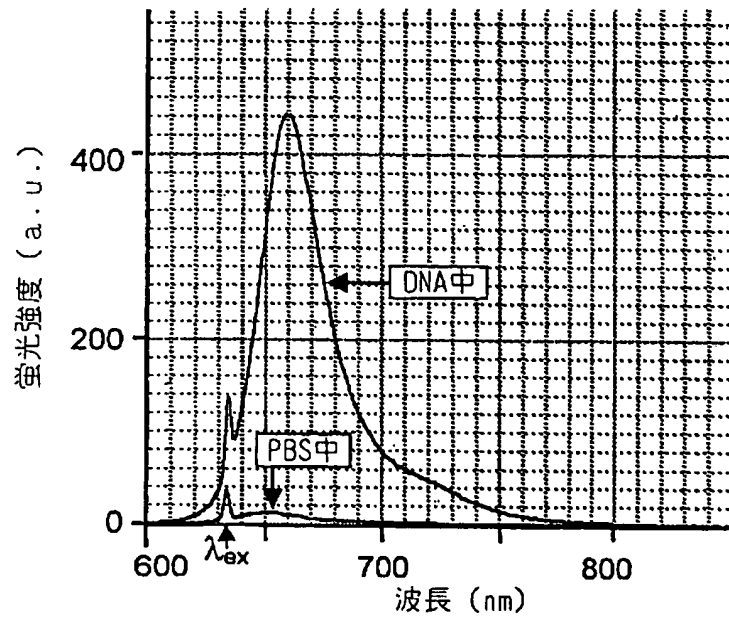


FIG. 9H

【図9I】

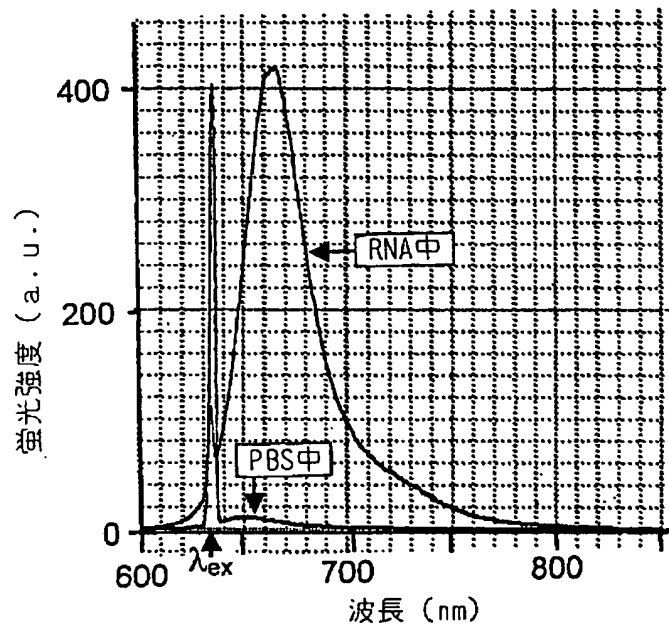


FIG. 9I

【図9J】

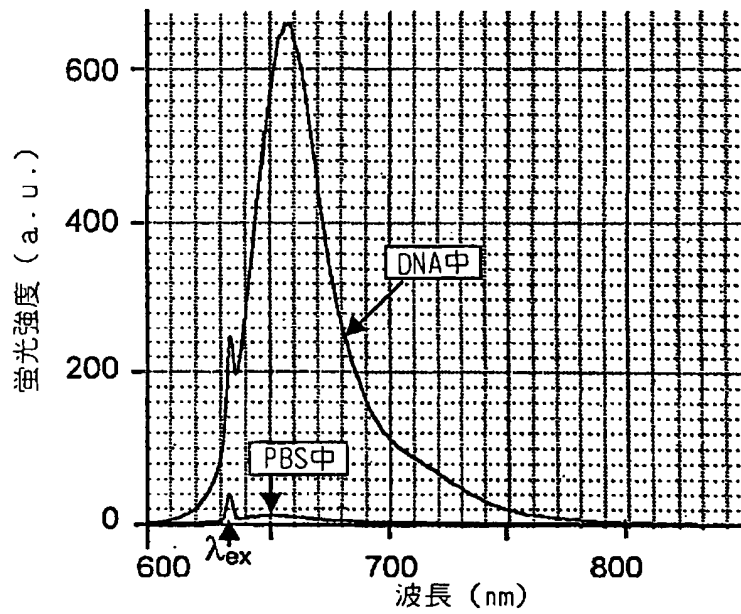


FIG. 9J

【図9K】

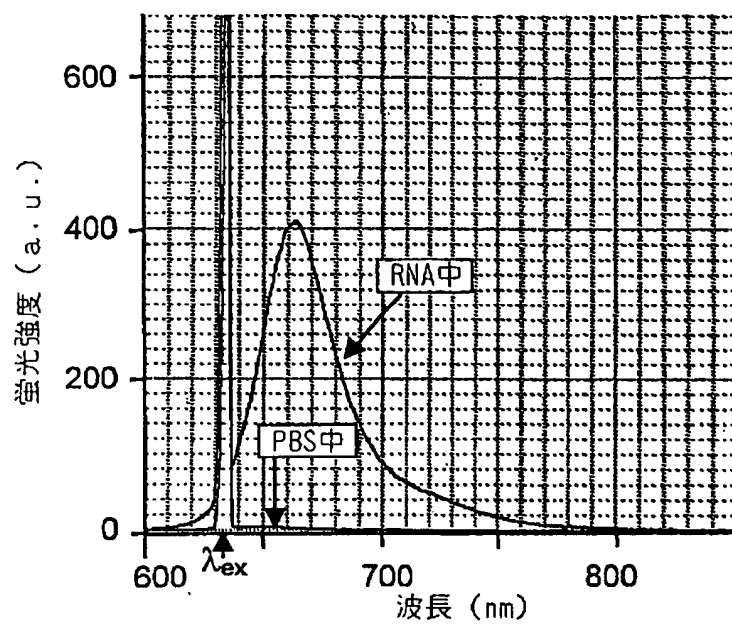


FIG. 9K

【図9L】

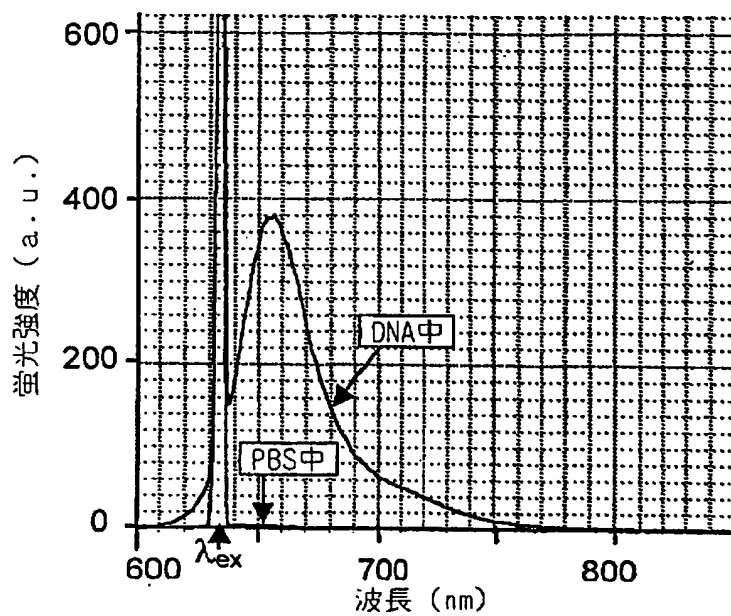


FIG. 9L



【図10A】

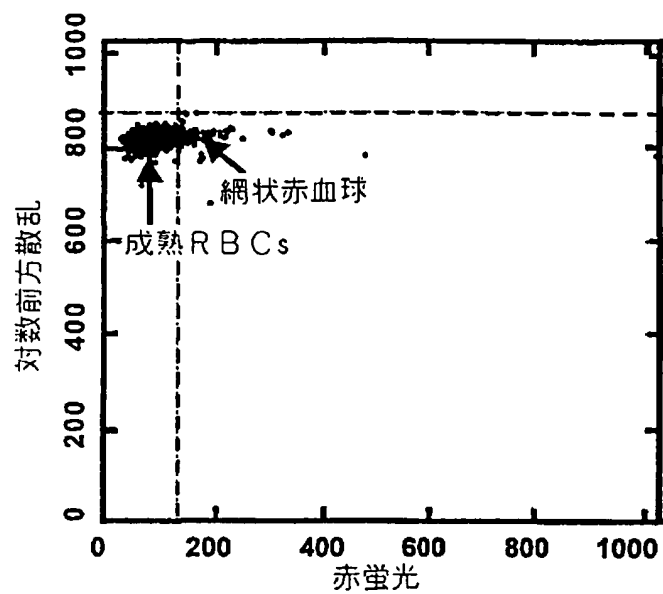


FIG. 10A

【図10B】

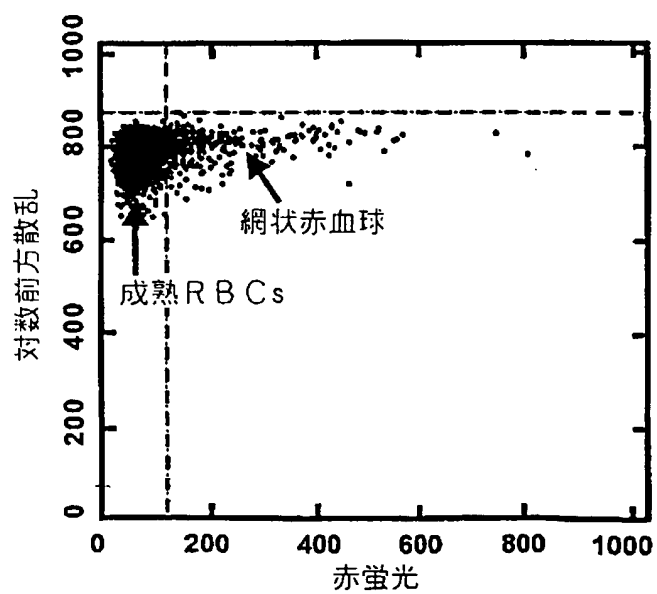


FIG. 10B

【図10C】

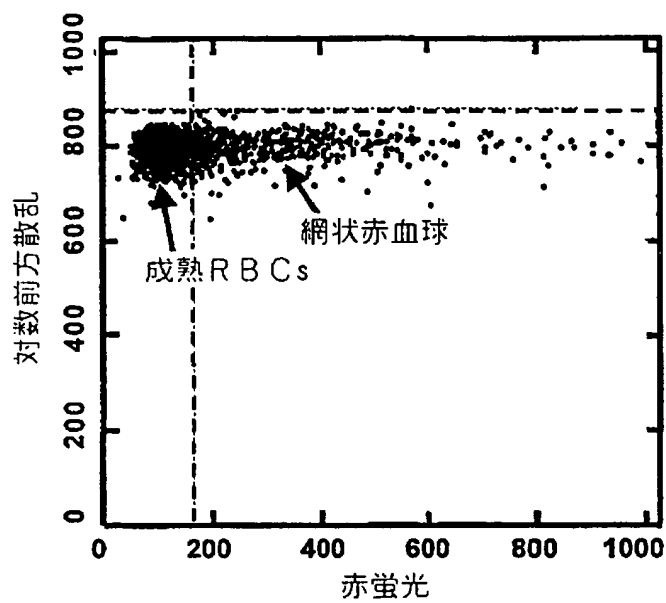


FIG. 10C

【図11A】

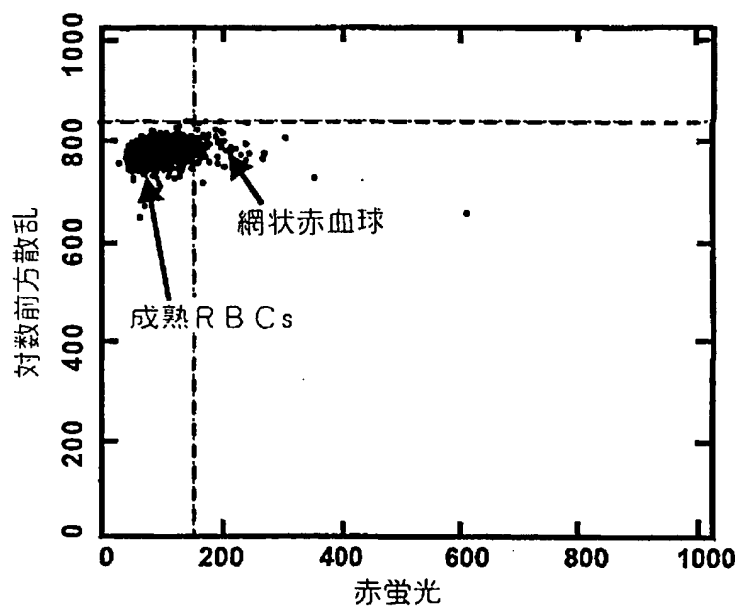


FIG. 11A

【図11B】

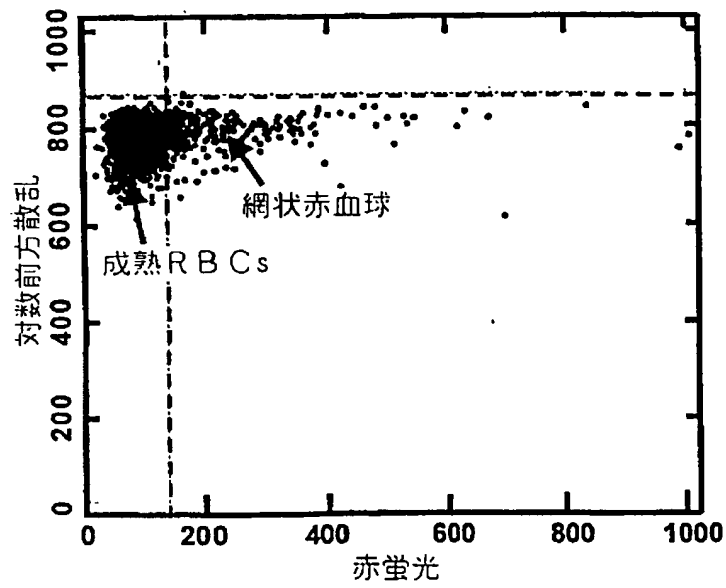


FIG. 11B

【図11C】

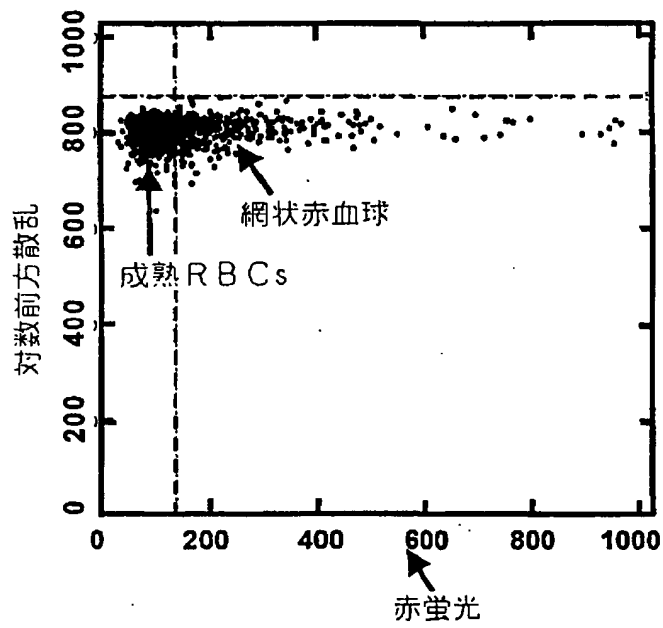


FIG. 11C

【図12A】

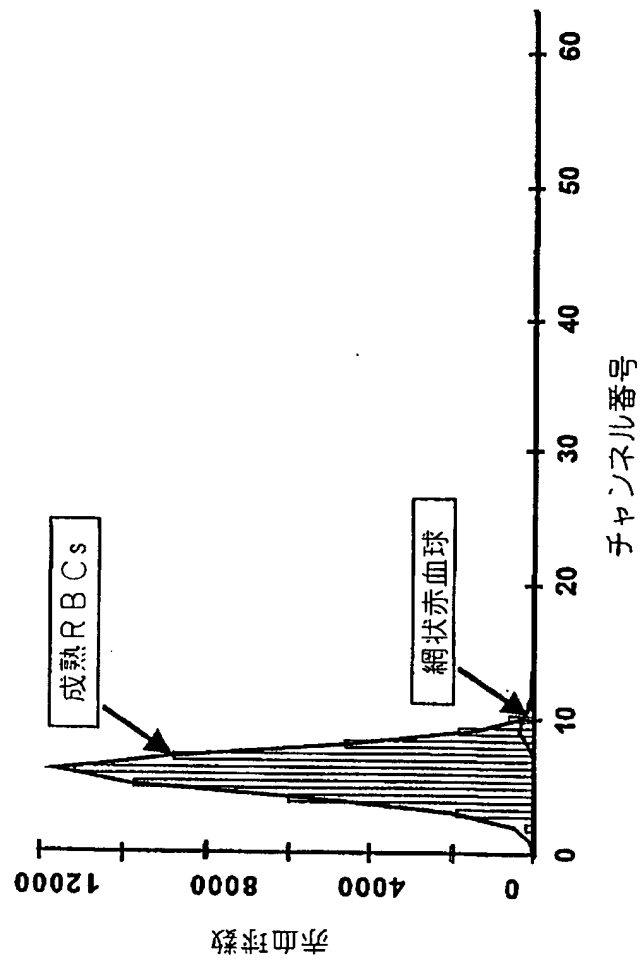


FIG. 12A

【図12B】

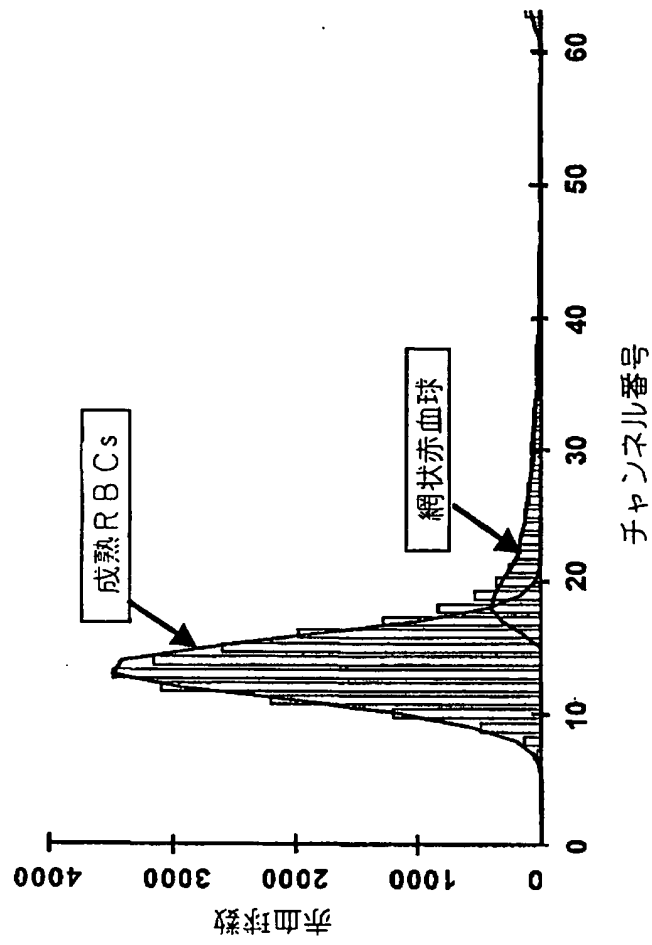


FIG. 12B

【図12C】

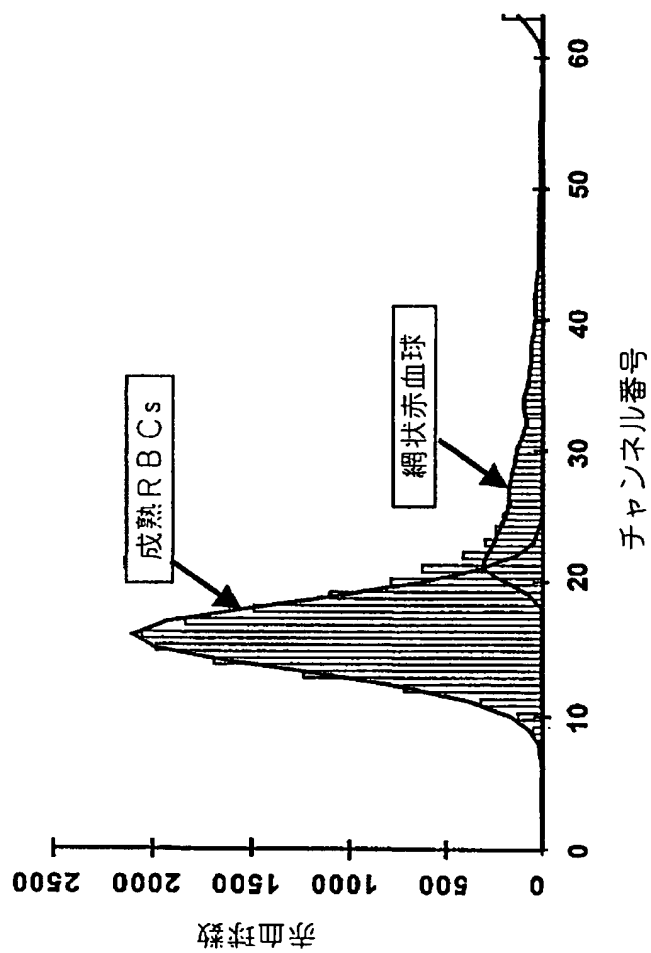


FIG. 12C

【手続補正書】

【提出日】平成15年3月19日(2003.3.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

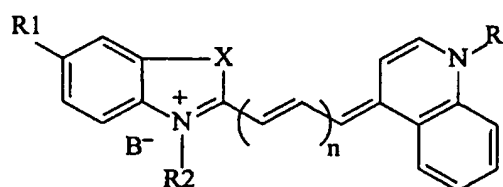
【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 以下の式：

【化1】



を有する色素であって、 $n$ は0、1、2又は3であり； $R_1$ はH、アルキル又はアルコキシ基であり； $R_2$ は $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_m\text{OH}$ であり、ここで、 $m$ は0、1、2又は3であり； $X$ はO、S又は $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ であり； $R$ は $\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、アルキル、アルキルスルホネート又はヒドロキシアリルであり、そして $\text{B}^-$ は対陰イオンである色素；及び

(b) 界面活性剤、保存料、及びスルホン酸又はその塩から成る群から選ばれる1以上の成分；  
を含む色素組成物。

【請求項2】 式中、 $n$ は1であり、 $R_1$ はHであり、 $R$ は $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ であり、 $R_2$ は $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ であり、そして $X$ はSである、請求項1に記載の色素組成物。

【請求項3】 式中、 $n$ は1であり、 $R_1$ はHであり、 $R$ は $CH(CH_3)_2$ であり、 $R_2$ は $CH_2CH_2OH$ であり、そして $X$ はSである、請求項1に記載の色素組成物。

【請求項4】 式中、 $n$ は1であり、 $R_1$ はHであり、 $R$ は $CH_3$ であり、 $R_2$ は $CH_2CH_2OH$ であり、そして $X$ はSである、請求項1に記載の色素組成物。

【請求項5】 式中、 $n$ は1であり、 $R_1$ は $CH_3$ であり、 $R$ は $CH_3$ であり、 $R_2$ は $CH_2CH_2OH$ であり、そして $X$ はSである、請求項1に記載の色素組成物。

【請求項6】 式中、 $n$ は1であり、 $R_1$ は $CH_3$ であり、 $R$ は $CH(CH_3)_2$ であり、 $R_2$ は $CH_2CH_2OH$ であり、そして $X$ はSである、請求項1に記載の色素組成物。

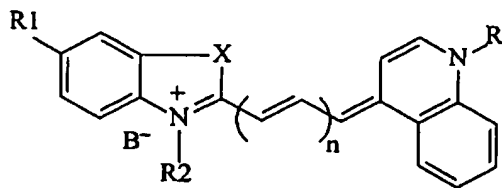
【請求項7】 式中、 $n$ は1であり、 $R_1$ は $CH_3$ であり、 $R$ は $CH_2CH_2OH$ であり、 $R_2$ は $CH_2CH_2OH$ であり、そして $X$ はSである、請求項1に記載の色素組成物。

【請求項8】 前記成分が界面活性剤である、請求項1に記載の色素組成物。

【請求項9】 前記成分がスルホン酸又はその塩である、請求項1に記載の色素組成物。

【請求項10】 核酸を含む血液細胞のサンプルを、以下の式：

【化2】



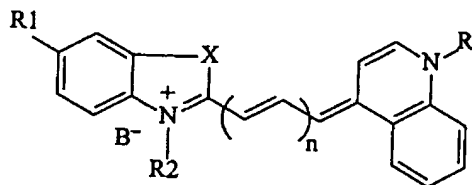


{式中、 $n$ は0、1、2又は3であり； $R_1$ はH、アルキル又はアルコキシ基であり； $R_2$ は $CH_2(CH_2)_mOH$ であり、ここで、 $m$ は0、1、2又は3であり； $X$ はO、S又は $C(CH_3)_2$ であり； $R$ は $CH_3$ 、 $CH(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH_2OH$ 、アルキル、アルキルスルホネート又はヒドロキシアルキルであり、そして $B^-$ は対陰イオンである。}を有する色素と接触させるステップを含む核酸の染色方法。

【請求項11】 前記血液細胞が有核赤血球細胞又は網状赤血球を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 以下の式：

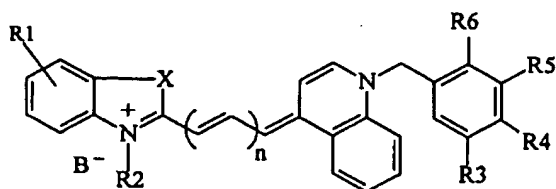
【化3】



{式中、 $n$ は0、1、2又は3であり； $R_1$ はH、アルキル又はアルコキシ基であり； $R_2$ は $CH_2(CH_2)_mOAc$ であり、ここで、 $m$ は0、1、2又は3であり； $X$ はO、S又は $C(CH_3)_2$ であり； $R$ は $CH_3$ 、 $CH(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH_2OAc$ 、アルキル、アルキルスルホネート又はヒドロキシアルキルであり、そして $B^-$ は対陰イオンである。}を有する色素。

【請求項13】 以下の式：

【化4】



式中、 $n$ は0、1又は2であり； $R_1$ はH、アルキル又はアルコキシ基であり； $R_2$ は $\text{CH}_2$ 、 $(\text{CH}_2)_m$ 、 $\text{OH}$ 又は $\text{CH}_3$ であり； $X$ はO、S又は $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ であり； $B^-$ は対陰イオンであり、そして $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ は特定化合物色素－3～色素－6についての式により示されるさまざまな置換基である。  
 により表される色素。

【請求項14】 式中、 $n=1$ ； $R_1=\text{H}$ ； $R=\text{CH}_3$ 、 $R_2=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OAc}$ ； $X=\text{S}$ 、及び $B^-$ は $\text{Br}^-$ である、請求項12に記載の色素。

【請求項15】 式中、 $n=1$ 、 $R_1=\text{H}$ 、 $R_2=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OAc}$ 、 $X=\text{S}$ 、及び $B^-$ は $\text{Br}^-$ である、請求項12に記載の色素。

【請求項16】 式中、 $n=1$ ； $X=\text{S}$ ； $R_1=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ； $R_2=R_4=R_5=\text{H}$ ； $R_3=\text{COCH}_3$ ；及び $B^-$ は $\text{Br}^-$ である、請求項13に記載の色素。

【請求項17】 式中、 $n=1$ ； $X=\text{S}$ ； $R_1=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ； $R_2=R_4=R_5=\text{H}$ ； $R_3=\text{COCH}_3$ ；及び $B^-$ は $\text{Br}^-$ である、請求項13に記載の色素。

【請求項18】 式中、 $n=1$ ； $X=\text{S}$ ； $R_1=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ； $R_2=R_3=R_4=R_5=\text{H}$ ；及び $B^-$ は $\text{Br}^-$ である、請求項13に記載の色素。

【請求項19】 式中、 $n=1$ ； $X=\text{S}$ ； $R_1=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ； $R_2=R_3=R_4=\text{H}$ ； $R_5=\text{B}(\text{OH})_2$ ；及び $B^-$ は $\text{I}^-$ である、請求項13に記載の色素。

【請求項20】 請求項12又は13に記載の色素に加えて、さらに界面活

性剤を含む、網状赤血球染色用色素組成物。

【請求項21】 請求項12又は13に記載の色素に加えて、さらにスルホン酸又はその塩を含む、色素組成物。

【請求項22】 請求項12又は13に記載の色素に加えて、さらに、保存料を含む、色素組成物。

【請求項23】 (a) 有核赤血球細胞又は網状赤血球を含む血液細胞サンプルを、請求項12又は13に記載の化合物と接触させて、上記有核赤血球細胞又は網状赤血球を前記化合物により染色し；及び(b) 網状赤血球の存在を検出するために、フローサイトメトリーにより上記染色された血液細胞サンプルを分析する：

のステップを含む、血液細胞サンプルの分析方法。

【請求項24】 フローサイトメトリーによる前記分析が1の蛍光パラメーター、並びに光分散、軸光損失、DC電気インピーダンス、及び無線周波数(RF)伝導性及びそれらの組み合わせから成る群から選ばれる少なくとも1のパラメーターの計測を含む、請求項23に記載の方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US01/14522

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : G01N 21/76, 33/48 US CL : 436/10, 63, 164, 166, 172, 800; 252/408.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/8, 10, 63, 164, 166, 172, 174, 800; 252/408.1; 435/2, 29, 30, 34 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields search Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN/REGISTRY, CA, ZCAPLUS, CAOLD, HCA, BIOSIS, MEDLINE search terms: structure search, dye, stain, reticulocyte		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim
X — A	US 4,386,146 A (KISHINO et al) 31 May 1983, columns 2-4 and claim 1.	1-9 — 10-72
X — A	US 5,599,932 A (BIENIARZ et al.) 04 February 1997, Figure 19, compound no. 52, Figure 21, compound no. 56, Figure 24, compound no. 66, and Figure 26, compound no. 69.	1, 4, 8-9 — 2-3, 5-7, 10-7
A	US 5,821,127 A (AKAI et al.) 13 October 1998, column 3, lines 21-67 and column 6, lines 21-54.	1-72
A	US 5,436,134 A (HAUGLAND et al.) 25 July 1995, column 3, lines 30-68 and columns 4-5.	1-72
A	US 5,658,751 A (YUE et al.) 19 August 1997, columns 13-14.	1-72
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 JULY 2001		Date of mailing of the international search report 02 AUG 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer MAUREEN WALLENHORST Telephone No. (703) 308-0661 DEBORAH THOMAS PARALEGAL SPECIALIST

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/58		G 0 1 N 33/58	A
(72)発明者	リー, ソン ワイ. アメリカ合衆国, フロリダ 33328, デイ ビー, サウスウエスト 106 テラス 3781		
(72)発明者	シェン, ジーン ジー. -ワイ. アメリカ合衆国, カリフォルニア 91765, ダイヤモンド バー, イースト ベンフィ ールド ブレース 24192		
(72)発明者	スジードロ, ステューブン アメリカ合衆国, フロリダ 33196, マイ アミ, サウスウエスト 101 ストリート 15822		
(72)発明者	ツァイ, ツォン-ツェー アメリカ合衆国, カリフォルニア 92867, オレンジ, イースト シャロウ ブロック レーン 3533		
(72)発明者	グブタ, ラビンダー アメリカ合衆国, フロリダ 33028, ベム ブロック バインズ, ノースウエスト 18 コート 13770		
F ターム (参考)	2G045 AA02 BB24 BB51 CA02 CA25 DA13 FA29 FB12 GC15 4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ42 QQ52 QR41 QR52 QR66 QR72 QS12 QS36 QX02 4H056 CA01 CC02 CC08 CE03 CE06 DD04 DD19		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**